



UNIVERSIDAD DE PANAMA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGIA

***IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES MAS FRECUENTES QUE CONFIEREN  
RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONLACIDA EN AISLADOS DE  
TUBERCULOSIS MULTIDROGA RESISTENTE EN PANAMA***

AUTOR

FEDORA LANZAS QUINTANA

CÉDULA 8 714 814

ASESOR

PROFESOR CARLOS RAMOS

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIZACIÓN EN GENETICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

OCTUBRE 2014

ST



10 MAR 2015

Título de la Tesis: **"Identificación de mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniácida en aislados de tuberculosis multidroga resistente en Panamá"**

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas,  
opción Genética y Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado  
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Ob.

  
**Doctor Carlos Ramos**  
**Presidente**

  
**Doctora Sara Ahumada**  
**Miembro**

  
**Profesora Brenda Mayorga**  
**Miembro**

REFRENDADO POR:

  
**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA  
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

**Gracias a Dios Todopoderoso quien es el unico con el poder de dar y quitar  
Gracias por darme la fortaleza y perseverancia para culminar esta fase del  
estudio sobrepasando cada una de las vicisitudes encontradas en el camino**

**Gracias a mi familia, y en este grupo incluyo a cada uno de mis amigos por  
darme apoyo y voz de aliento en el momento oportuno**

**Gracias a cada uno de los colaboradores nacionales e internacionales por su  
apoyo incondicional en cada una de las fases del estudio**

**Gracias a cada uno de los profesores del Programa de Maestria que  
contribuyeron en mi formación para la obtención de este nuevo grado en mi  
carrera profesional Muy especialmente al Profesor Carlos Ramos por su  
guia y apoyo como tutor nacional y al Dr Petros Karakousis y al Dr Thomas  
Ioerger como tutores internacionales**

**Entonces el Señor dijo Si tuvierais fe como un grano de mostaza podriais  
decir a este sicomoro Desarraigate y plantate en el mar y os obedeceria.**

**Lucas 17 6**

*En memoria de todos aquellos  
que han sufrido directa o indirectamente  
por la Tuberculosis*

## **INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS</b>	<b>6</b>
<b>FUNDAMENTACION TEÓRICA</b>	<b>7</b>
<b>1 GENERALIDADES DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>7</b>
<b>1 1 Descubrimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>7</b>
<b>1 2 Características Morfológicas y taxonomía de <i>M tuberculosis</i></b>	<b>9</b>
<b>1 3 Componentes de la envoltura de <i>M tuberculosis</i> y su rol en la inmunopatogénesis</b>	<b>16</b>
<b>1 3 1 Componentes estructurales</b>	<b>17</b>
<b>1 3 1 1 Componentes con alto contenido de Manosa</b>	<b>22</b>
<b>1 3 1 2 Componentes ricos en Arabinosa y Galactosa</b>	<b>25</b>
<b>1 4 Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>27</b>
<b>2 Patogenia de la Tuberculosis</b>	<b>31</b>
<b>2 1 Exposición sin infección</b>	<b>33</b>
<b>2 2 Infección latente</b>	<b>34</b>
<b>2 3 Enfermedad</b>	<b>35</b>
<b>2 3 1 Manifestaciones clinicas de la enfermedad</b>	<b>37</b>
<b>3 Tratamiento</b>	<b>39</b>

3 1 Mecanismo de acción y mecanismo de resistencia de los principales fármacos del tratamiento antifímico Isoniacida y Rifampicina	48
3 1 1 Isoniacida	48
3 1 1 1 Mecanismo de acción de la Isoniacida	48
3 1 1 2 Genes involucrados en los mecanismos de resistencia a Isoniacida	50
3 1 2 Rifamicinas	55
3 1 2 1 Mecanismo de Acción de Rifampicina	57
3 1 2 2 Gen involucrado en los mecanismos de resistencia a Rifampicina	58
METODOLOGIA	61
1 TIPO DE ESTUDIO	61
2 UNIVERSO	61
3 MUESTRAS	61
4 CRITERIO DE INCLUSION	61
5 CRITERIO DE EXCLUSIÓN	61
6 METODOS	62
6 1 Identificación a nivel molecular de las cepas en estudio utilizando el kit comercial ACCUPROBE GENPROBE	62
6 2 Extracción de ADN genómico utilizando el kit comercial de Qiagen	68

6 3 Amplificación de los genes katG inhA inhA mabA y rpoB involucrados en la resistencia a Isoniacida y Rifampicina respectivamente	69
6 3 1 Electroforesis en gel de agarosa	71
6 3 2 Purificación de productos de PCR	72
6 4 Secuenciación de los genes involucrados en la resistencia a Rifampicina e Isoniacida de las cepas en estudio e identificación de las mutaciones	73
6 4 1 Edición de secuencias	73
6 4 2 Analisis de los productos de secuenciación	74
6 5 Reaccion en cadena de la polimerasa multiple alelo específico (PCRMAS)	74
6 5 1 Ciclo de amplificación	75
6 5 2 Deteccion	75
6 6 Comparación de los resultados obtenidos por PCRMAS	76
RESULTADOS	77
DISCUSION	131
CONCLUSION	137
RECOMENDACIONES	139
CITAS BIBLIOGRAFICAS	140

## **INDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1</b>	<b>37</b>
<b>Diferencias entre la infección de tuberculosis latente y la enfermedad de tuberculosis</b>	
<b>TABLA 2</b>	<b>67</b>
<b>ACCUPRO Luminómetro 50i</b>	
<b>TABLA 3</b>	<b>71</b>
<b>Mezcla de Reacción para la amplificación de los genes en estudio</b>	
<b>TABLA 4</b>	<b>73</b>
<b>Mezcla de reacción para secuenciación</b>	
<b>TABLA 5</b>	<b>75</b>
<b>Mezcla de reacción para PCRMAS</b>	
<b>TABLA 6</b>	<b>89</b>
<b>Concentraciones de ADN</b>	
<b>TABLA 7</b>	<b>118</b>
<b>Mutaciones identificadas por secuenciación de Aislados multidroga resistente</b>	



<b>TABLA 8</b>	<b>120</b>
----------------	------------

**Mutaciones identificadas por secuenciación de Aislados sensibles**

<b>TABLA 9</b>	<b>124</b>
----------------	------------

**Mutaciones identificadas por PCRMAS de Aislados multidroga resistente**

<b>TABLA 10</b>	<b>126</b>
-----------------	------------

**Mutaciones identificadas por PCRMAS de Aislados sensibles**

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b>	<b>22</b>
<b>Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i></b>	
<b>FIGURA 2</b>	<b>26</b>
<b>Inmunopatogénesis de la Tuberculosis pulmonar</b>	
<b>FIGURA 3</b>	<b>36</b>
<b>Patogenia de la tuberculosis</b>	
<b>FIGURA 4</b>	<b>40</b>
<b>Representación esquematizada de la enfermedad de un foco caseoso</b>	
<b>FIGURA 5</b>	<b>47</b>
<b>Fármacos contra <i>M. tuberculosis</i></b>	
<b>FIGURA 6</b>	<b>48</b>
<b>Estructura química de la Isoniacida</b>	
<b>FIGURA 7</b>	<b>52</b>
<b>Esquema de la ruta biosintética de los ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias</b>	

<b>FIGURA 8</b>	<b>90</b>
<b>Productos de amplificación de los genes <i>inhA inhA mabA katG</i> y <i>rpoB</i></b>	
<b>FIGURA 9</b>	<b>121</b>
<b>Electroforesis de los genes <i>inhA, inhA mabA katG</i> y <i>rpoB</i></b>	
<b>FIGURA 10</b>	<b>122</b>
<b>Electroforesis de los productos de amplificación de PCRMAS</b>	
<b>FIGURA 11</b>	<b>123</b>
<b>Electroforesis de los productos de amplificación de PCRMAS</b>	
<b>FIGURA 12</b>	<b>132</b>
<b>Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a INH en aislados MDR</b>	
<b>FIGURA 13</b>	<b>133</b>
<b>Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a RIF en aislados MDR</b>	
<b>FIGURA 14</b>	<b>135</b>
<b>Rango de edad versus género de los aislados en estudio</b>	
<b>FIGURA 15</b>	<b>136</b>
<b>Porcentaje de casos MDR por año y distribución geográfica</b>	

## **INDICE DE CUADROS**

<b>CUADRO 1</b>	<b>10</b>
<b>Clasificación según el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</b>	
<b>CUADRO 2</b>	<b>11</b>
<b>Clasificación de micobacterias que causan frecuentemente infecciones en humanos (Runyon 1959)</b>	
<b>CUADRO 3</b>	<b>15</b>
<b>Complejo Mycobacterium tuberculosis</b>	
<b>CUADRO 4</b>	<b>70</b>
<b>Cebadores y condiciones para la amplificación de los genes en estudio</b>	
<b>CUADRO 5</b>	<b>74</b>
<b>Lista de cebadores para PCRMAS</b>	

## **ABREVIATURAS**

- 1 AG Arabinogalactano**
- 2 BAAR Bacilo alcohol ácido resistente**
- 3 BCG Bacillus de Calmette y Guérin**
- 4 DIM Ftihiceroi dimicocerosato**
- 5 EMB Etambutol**
- 6 ETH Etionamida**
- 7 GLP Glicopeptidolipidos**
- 8 INH Isoniacida**
- 9 LAM Lipoarabinomanana**
- 10 LOS Lipooligosacáridos**
- 11 ManLAM LAM manosilada**
- 12 MDR Multi droga resistente**
- 13 CIM Concentración inhibitoria mínima**

- 14 MTB Mycobacterium tuberculosis**
- 15 NAD Nicotinamida adenina dinucleótido**
- 16 NAG N acetil glucosamina**
- 17 NAM N acetilmurámico**
- 18 ORFs Open Reading Frame**
- 19 PAS Acido paraminosalicílico**
- 20 PE Motivos Prolina – Acido Glutámico**
- 21 PPE Prolina – Prolina – Acido Glutámico**
- 22 PG Peptidoglicano**
- 23 PGL Fenoglicolípidos**
- 24 PGRSs Secuencias polimórficas ricas en G+C**
- 25 PILAM LAMs cubiertos con fosfoinositol**
- 26 PIM Fosfatidilinositolmanósidos**
- 27 PZA Piracinamida**
- 28 RIF Rifampicina**

**29 STR Estreptomicina**

**30 TB Tuberculosis**

**31 TB MDR Tuberculosis Multi droga resistente**

**32 TDM Trehalosa dimicolato**

## **RESUMEN**

**Tuberculosis multidroga resistente (TB MDR) se define como la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los dos principales fármacos del tratamiento antifímico de primera línea, Isoniacida y Rifampicina. TB MDR representa una amenaza al control global de la TB ya que para su tratamiento se utilizan fármacos de segunda línea, los cuales son menos efectivos, más caros y más tóxicos. Por lo tanto, un diagnóstico rápido y la prevención de la TB MDR en la comunidad es indispensable.**

**Actualmente se han logrado grandes avances tecnológicos en el desarrollo de pruebas moleculares rápidas para el diagnóstico oportuno de TB MDR debido a que existe una mejor comprensión de los mecanismos genéticos de droga resistencia en *M. tuberculosis*. Una de las grandes ventajas de utilizar pruebas moleculares en la detección de resistencia es que acorta el tiempo de diagnóstico significativamente, lo que hace posible interrumpir la cadena de transmisión de manera oportuna.**

**Polimorfismos de nucleótido simple es la principal causa de droga resistencia y a nivel mundial se han descrito las mutaciones más comunes que confieren resistencia a los principales fármacos antifímicos.**

**Aunque la frecuencia de mutaciones genéticas individuales que confieren resistencia ha sido reportada en algunos países de América, no encontramos**



**al momento de la realización de nuestro estudio publicaciones similares en América Central**

**El principal objetivo de este estudio es identificar las mutaciones presentes en una colección de aislados TB MDR recolectados durante los años 2001 2011 en el Departamento de Micobacteriología del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud Para ello secuenciamos los aislados TB MDR y a la vez evaluamos la capacidad de una técnica molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa multiple alelo específico en la detección de resistencia debido a que es una técnica económica y rápida utilizada en países con alta carga de TB MDR**

**Los resultados obtenidos en este estudio nos permitirán tener una mejor comprensión de la tuberculosis resistente que circula en nuestro país (dada su posición geográfica como ruta de tránsito) y a la vez servirán como base en la elección de una técnica molecular capaz de detectar la mayor cantidad de mutaciones prevalentes en nuestro país**

## **INTRODUCCION**

**La tuberculosis multidroga resistente (TB MDR) se define como aquel caso donde el paciente excreta bacilos resistentes a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF) <sup>(2)</sup> Actualmente constituye un problema importante para los responsables del control de la tuberculosis (TB) en muchos países La TB MDR se propaga de persona a persona, lo que se conoce como resistencia primaria y esto podría resultar en una epidemia de TB con opciones terapéuticas restringidas La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año 424 000 personas adquieren TB MDR, una forma de TB que no responde al tratamiento estándar <sup>(2)</sup>**

**En el 2010 se estimaron unos 6 200 casos de TB MDR entre los casos de TB notificados en la región de las Américas Siete países representaron más de 80% de los casos de TB MDR en la región (Peru, Brasil México Ecuador Haití Republica Dominicana y Colombia) <sup>(1)</sup>**

**Datos del 2007 de la OMS demuestran que en Panamá la TB MDR representa 1 5% de los casos nuevos y 9 7% de los casos previamente tratados**

**Ante esta realidad los esfuerzos por reducir el tiempo de detección de los casos TB MDR adquieren a nivel mundial y local gran importancia. El manejo de la TB MDR se centra en la expansión de las medidas de control de la TB MDR (capacitación guías) a nivel de país, la cobertura de la prueba de sensibilidad a medicamentos, la detección de casos de TB MDR y el tratamiento de segunda línea.**

**En Panamá la detección de estos casos se realiza de manera normativa y operacional, la sección de Micobacteriología del Laboratorio Central de Referencia de Salud Pública del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (LCRSP-ICGES). El método utilizado es el método estándar de las proporciones múltiples de Canetti-Rist y Grosset, método que emplea medios de cultivos convencionales que requieren de largos periodos de incubación.** <sup>(130)</sup>

**En un comunicado de prensa de la OMS en el 2010, en materia de reforzamiento de los laboratorios, se notificó que es necesario ampliar y acelerar urgentemente en los países el acceso a tecnologías nuevas y rápidas que puedan diagnosticar la TB MDR en dos días en lugar de los métodos tradicionales que llegan a tardar hasta cuatro meses.** <sup>(2)</sup>

Con la finalidad de ampliar y fortalecer los conocimientos en materia de TB MDR a nivel nacional nos proponemos en este trabajo identificar las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida mediante la secuenciación de los genes *rpoB* *katG* *inhA* e *inhA mabA* respectivamente. La información generada permitirá determinar las mutaciones presentes en las cepas resistentes de tuberculosis que circulan en nuestro país y su frecuencia.

Una vez identificadas las mutaciones más frecuentes se evaluará la utilización de la Reacción en cadena de la polimerasa múltiple alelo específico (PCRMA) en la detección de las mutaciones que circulan en nuestro país.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Identificar las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida en una colección de cepas de tuberculosis multidroga resistente de Panamá que data de los años 2001 2011**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Amplificar los genes *katG inhA inhA maba* y *rpoB* involucrados en la resistencia a isoniacida y rifampicina, respectivamente**
- 2 Secuenciar los productos de amplificación de los genes *katG inhA inhA maba* y *rpoB* Reconocer en las secuencias dónde se presentan los cambios**
- 3 Comparar los resultados obtenidos con la prueba PCRMAS con los obtenidos por el método de referencia**

## **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

### **1 GENERALIDADES DE *Mycobacterium tuberculosis***

#### **1.1 Descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis***

Robert Koch médico y científico alemán presentó el 24 de Marzo de 1882 su descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) agente causal de la enfermedad conocida como tuberculosis (TB). Koch comenzó recordando a la audiencia de las estadísticas aterradoras. Si la importancia de una enfermedad para la humanidad se mide por el número de muertes que provoca, la TB debe ser considerada mucho más importante que las enfermedades infecciosas más temidas: la peste, el cólera y similares. Uno de cada siete de todos los seres humanos muere de TB. Y si sólo se tiene en cuenta a los grupos de mediana edad productiva, la tuberculosis representa mucho más de un tercio.<sup>(3)</sup> La conferencia de Koch, considerada por muchos como la más importante en la historia clínica, era tan innovadora, inspiradora y profunda, que sentó las bases para los procedimientos científicos del siglo XX. Él describió cómo había inventado un nuevo método de tinción y lo demostró durante la audiencia. Koch llevó todo su laboratorio a la sala de conferencias: microscopios, tubos de ensayo con cultivos, portaobjetos de vidrio con bacterias teñidas, colorantes, reactivos, frascos de vidrio con las muestras de tejido, etc. Él quería que la audiencia

revisara por si misma sus conclusiones Koch mostró disecciones de tejidos de los conejillos de indias que fueron infectados tambien de pulmones de monos infectados de cerebro y pulmones de seres humanos que habian muerto de TB de las lesiones en los pulmones de los pacientes con infecci3n cr3nica y de las cavidades del abdomen de ganado infectado con TB En todos los casos la enfermedad que se habia desarrollado en los conejillos de indias infectados experimentalmente era la misma, y los cultivos de bacterias tomadas de los conejillos de indias infectados eran id3nticos El publico se qued3 at3nito Poco a poco la gente se levanto y comenz3 a buscar en los microscopios para ver las bacterias de la TB con sus propios ojos

Un a1o antes el 18 de Agosto de 1881 en su laboratorio durante una tinci3n con azul de metileno (de material procedente de tub3rculos reci3n formados) Koch descubri3 unas estructuras de forma alargada, que no podia ver si no aplicaba ese colorante Para mejorar el contraste decidi3 a1adir marr3n de Bismarck, descubriendo que las estructuras se volvian brillantes y transparentes Y mejor3 la t3cnica empleando 3lcali hasta determinar la concentraci3n id3nea para la visualizaci3n de los bastones Koch habia dado con la combinaci3n que permitia te1ir la peli3cula cubierta del bacilo de la TB una mezcla de fucsina y anilina, cuyas propiedades b3sicas permitian visualizar al microorganismo

Mas tarde en Alemania Franz Zielh y Friedrich Neelsen mejoran el método de tinción para MTB y a partir de entonces se conocerá como la Tinción de Ziehl Neelsen <sup>(3)</sup>

## **1 2 Características morfológicas y taxonomía de *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* tiene un tamaño de 0,2 a 0 6 x 1 a 10 micras alcohol ácido resistente (BAAR) frecuentemente incolora y aeróbica estricta Su crecimiento está subordinado a presencia de oxígeno y al pH circundante Es muy resistente al frío congelación y desecación Es muy sensible al calor luz solar y luz ultravioleta Su multiplicación es muy lenta Se divide cada 16 a 20 horas Ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente y retrasar su multiplicación por algunos días hasta varios años El reservorio natural de MTB es el ser humano tanto el sano infectado como el enfermo

La enfermedad se puede manifestar en cualquier órgano del cuerpo Lo más frecuente es la infección en los pulmones y puede propagarse a otros órganos por vía sanguínea o linfática <sup>(4)</sup>

Las micobacterias pertenecen al orden de los actinomicetales (bacterias con formas de hongos) y son consideradas formas de transición entre las eubacterias (bacterias verdaderas) y los hongos (Cuadro 1)



**Cuadro 1**  
**Clasificación segun el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**

<b>Dominio</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Phylum</b>	<b>Filum BXIV Actinobacteria</b>
<b>Clase</b>	<b>Actinobacteria</b>
<b>Sub Clase</b>	<b>Actinobacteridae</b>
<b>Orden</b>	<b>Actinomycetales</b>
<b>Sub orden</b>	<b>Corynebacterineae</b>
<b>Familia</b>	<b>Mycobacteriaceae</b>
<b>Género</b>	<b>Mycobacterium</b>
<b>Especie</b>	<b>Tuberculosis</b>

En 1950 Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil del genero *Mycobcaterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento (rápido o lento segun sea superior o inferior a una semana) producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales En el Cuadro 2 se presenta la clasificación modificada de Runyon que incluye los miembros del género *Mycobacterium* <sup>(5)</sup>

## Cuadro 2

### Clasificación de micobacterias que causan frecuentemente infecciones en humanos (Runyon 1959)

<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. bovis</i>
<i>M. africanum</i>
<i>M. leprae</i>
Micobacterias de crecimiento lento (más de 7 días)
<i>M. kansasii</i> (fotocromógenos grupo I de Runyon)
<i>M. marinum</i>
<i>M. goodii</i> (escotocromógenos grupo II)
<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. avium</i> complex (no cromógenos grupo III)
<i>M. avium</i>
<i>M. intracellulare</i>
<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. terrae</i> complex
<i>M. ulcerans</i>
<i>M. xenopi</i>
Micobacterias de crecimiento rápido (grupo IV de Runyon)
<i>M. fortuitum</i>
<i>M. chelonae</i>
<i>M. abscessus</i>

Runyon EH. Antimicrobial chemotherapy in pulmonary disease. Med Clin North Am 1959;43:273-80. Traducido por Griffiths Walker.

Actualmente el género *Mycobacterium* incluye más de cien especies divididas para fines didácticos en tres grupos complejo tuberculosis complejo lepra y otras micobacterias <sup>(6)</sup>

- **Complejo tuberculosis**

El complejo tuberculosis está conformado por las especies que causan la enfermedad de TB en humanos y en animales *Mycobacterium tuberculosis* *M. microti* *M. africanum* *M. bovis* *M. canettii* *M. caprae* *M. pinnipedii*

*M mungi* *M orygis* (Cuadro 3) *M tuberculosis* es la especie más frecuentemente aislada en humanos <sup>(6)</sup> Estudios de homología muestran que todas las especies que conforman el complejo tuberculosis tienen una similitud del 95 100% en su ADN

### ***Mycobacterium tuberculosis***

Es la bacteria responsable de la mayor cantidad de casos de TB en el mundo  
Descrita por primera vez el 24 de Marzo de 1882 por Robert Koch El reservorio natural de *M tuberculosis* es el ser humano tanto el sano infectado como el enfermo Puede causar enfermedad en cualquier órgano del cuerpo siendo la infección en los pulmones la más frecuente De allí por vía sanguínea o linfática se propaga a otros órganos

### ***Mycobacterium microti***

Los reservorios naturales de esta bacteria son pequeños roedores gatos y otros mamíferos domésticos Es de muy lento crecimiento En humanos se han reportado casos de enfermedad pulmonar ganglionar abdominal y meníngea Se ha usado como modelo para investigar posibles vacunas contra la TB

### ***Mycobacterium africanum***

Responsable de más del 50% de los casos con baciloscopia positiva en África Occidental. La enfermedad producida por *M. africanum* no se diferencia clínicamente de la causada por *M. tuberculosis*.

### ***Mycobacterium bovis***

Es prácticamente indistinguible de *M. tuberculosis*. La forma de transmisión puede ser la habitual entre humanos, pero en general se produce por el consumo de productos animales contaminados o contacto con animales enfermos. La enfermedad clínicamente es idéntica a la causada por *M. tuberculosis*.

La vacuna Bacillus de Calmette y Guérin (BCG) contra la TB se prepara a partir de extracto atenuado de *Mycobacterium bovis* que ha perdido su virulencia, manteniendo su poder antigénico.

### ***Mycobacterium canettii***

Los casos de TB producidos por esta especie son de África y la presentación es usualmente pulmonar.

### ***Mycobacterium caprae***

Aislada en 1999 de cabras con enfermedad tuberculosa diseminada. Se ha encontrado también en cerdos salvajes y vacas.

***Mycobacterium pinnipedii***

Se considera a los pinnípedos como su hospedero natural pero también produce enfermedad en roedores tapires vacas y en el humano La vía de transmisión parece ser la aérea La presentación de la enfermedad es diversa pudiendo afectar un área o ser diseminada Se ha descrito zoonosis desde lobos marinos a humanos

***Mycobacterium mungi***

Fue descrita en el 2010 en suricatos africanos en quienes la enfermedad afecta el tracto respiratorio superior Aun no se conoce con exactitud su ciclo biológico y forma de transmisión

***Mycobacterium orygis***

Aislada en humanos al sur y sudeste asiático Siendo un agente causal de TB en oryxes gacelas antílopes vacas monos Rhesus al sur de Asia y seres humanos

**Cuadro 3**  
**Complejo *Mycobacterium tuberculosis***

<b>Bacterias del complejo</b>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Koch 1882
<i>Mycobacterium microti</i>	Wells 1937
<i>Mycobacterium africanum</i>	Castets 1968
<i>Mycobacterium bovis</i>	Lessel & Karlson 1970
<i>Mycobacterium canettii</i>	vanSoolingen 1997
<i>Mycobacterium caprae</i>	Aranaz 1999
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	Cousins 2003
<i>Mycobacterium mungi</i>	Alexander 2010
<i>Mycobacterium orygis</i>	vanIngen 2012

- **Complejo lepra**

En este complejo se incluye la especie *M leprae* productor de la lepra humana. Conocida también como el *bacilo de Hansen*. Fue descubierta en 1874 por Gerhard Armauer Hansen. Es intracelular y pleomórfica, aunque usualmente tiene forma de bastón <sup>(6)</sup>

- **Otras micobacterias**

En este grupo encontramos las micobacterias atípicas o ambientales que están ampliamente distribuidas en el medio ambiente fundamentalmente en el agua y en la tierra, sus principales reservorios. La transmisión persona a

persona es rara, en la afección respiratoria el mecanismo de transmisión más aceptado son los aerosoles en el medio ambiente y la ingesta por vía digestiva. Durante muchos años la descripción de estas enfermedades producidas por micobacterias ambientales denominadas en su conjunto micobacteriosis era un hecho ocasional y casi anecdótico la gran mayoría de las veces ligado a situaciones de inmunodeficiencia. Sin embargo en los últimos años ha pasado a ser una patología relativamente frecuente sobre todo condicionada a la aparición de la epidemia de SIDA lo que ha conllevado un incremento paralelo en la investigación y conocimientos de estas micobacterias <sup>(6)</sup>

### **1.3 Componentes de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* y su rol en la inmunopatogénesis**

La envoltura de MTB es compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática <sup>(7)</sup>. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos. Por tanto tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune <sup>(8)</sup>. Sus características y composición varían en las diferentes especies y cepas de micobacterias. Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos. Estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria <sup>(7, 9)</sup>

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática <sup>(10)</sup> Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos arabinogalactano peptidoglucano (mAGP) <sup>(11)</sup> Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para micobacterias y bacterias de géneros relacionados como *Nocardia* y *Corinebacterium* en el caso de las micobacterias los ácidos micólicos tienen de 70 80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura <sup>(9)</sup>

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomana (LAM) que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB <sup>(7)</sup>

### **1.3 1 Componentes estructurales**

Las micobacterias presentan una gran diversidad de estructuras glicosiladas complejas con enlace de tipo O glicosídico Algunos de estos glicoconjugados son de importancia estructural como el peptidoglucano (PG)



y los polisacáridos El PG es una molécula estructural mientras que los polisacáridos protegen a la bacteria de la lisis por el complemento <sup>(12)</sup>

Los componentes mayoritarios de la envoltura de las micobacterias son lípidos asociados a carbohidratos (glicolípidos) fosfolípidos glicosilados o carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico o péptidos Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmune innata y específica del hospedero <sup>(13)</sup>

Se estima que el 25% del peso seco de las micobacterias corresponde a lípidos o glicolípidos el 40% de ellos son moléculas de ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, que es un disacárido de  $\alpha$  D glucosa formado por residuos de  $\alpha$  D glucopiranosil (1 1)- $\alpha$  glucopiranososa La trehalosa es un antígeno presente en numerosas moléculas de micobacterias y existen varias moléculas que contienen este disacárido las cuales se clasifican en micolatos de trehalosa y sulfolípidos de trehalosa <sup>(14)</sup>

Los *micolatos de trehalosa* son ácidos micólicos unidos a una trehalosa, cuando están acetilados constituyen parte de la trehalosa dimicolato (TDM) o factor cuerda o parte del fiticérol dimicocerosato (DIM) <sup>(14)</sup>

*El factor cuerda (trehalosa 6 6 – dimicolato)* es una molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura Es abundante en todas las micobacterias patógenas Recibe ese nombre porque en los cultivos los

microorganismos forman agregados semejantes a cordones. Esta molécula presenta pequeñas variaciones en ciertos grupos químicos las que son características en las diversas especies de micobacterias y cepas <sup>(15)</sup> El factor cuerda está formado por un conjunto de tres macromoléculas: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y micolatos. En condiciones normales el factor cuerda estimula la actividad de la enzima que hidroliza el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa) en el hospedero, lo que trae como consecuencia la disminución en la cantidad de la coenzima NAD <sup>(16)</sup> Esta coenzima es común en las reacciones catabólicas de óxido-reducción y la ausencia de NAD interrumpe la cadena respiratoria en la mitocondria. El factor cuerda es inmunogénico y se ha intentado usarlo en la prevención de la tuberculosis <sup>(16, 17)</sup> además su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón <sup>(18)</sup> La formación del granuloma es producto de una serie de mecanismos de la respuesta inmune que da por resultado una activación y diferenciación de los macrófagos mediada principalmente por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ) conteniendo la diseminación de la bacteria <sup>(19)</sup> El factor cuerda también se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. tuberculosis* en estas células <sup>(8)</sup>

***Phthiocerol dimycocerosato (DIM)*** es una molécula que contiene trehalosa, es un ácido graso de 35 carbonos y tiene sustituciones con grupos metilos y dos ácidos grasos (ácidos micocerósidos) Esta molécula es característica de las cepas patógenas y forma una barrera que impide la permeabilidad de la envoltura de las micobacterias <sup>(10)</sup>

Los ***sulfolípidos de trehalosa (SL)*** son llamados también sulfatidos son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfatos y se localizan en la periferia de la pared celular y parecen ser factores de virulencia En *Mycobacterium tuberculosis* estos sulfolípidos de trehalosa funcionan como evasinas es decir moléculas que facilitan que la bacteria escape a la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual puede explicar el éxito como parásitos intracelulares <sup>(9 10)</sup> Los sulfolípidos son responsables de las características de tinción de las micobacterias <sup>(9)</sup> y se unen a los receptores "basurero" de clase A (ScR) o receptores scavenger en macrófagos lo que favorece la entrada de la bacteria a la célula hospedera. <sup>(10)</sup> Además evita la maduración del fagosoma del macrófago cuando está infectado por la micobacteria porque inhiben a la proteína C cinasa (PKT) <sup>(8)</sup> y como consecuencia de esto también se ve inhibida la producción de óxido nítrico y de citosinas pro inflamatorias <sup>(20 21)</sup>

Los *glicolipidos con trehalosas acetiladas* son abundantes en la cápsula de las micobacterias y se clasifican en fenoglicolipidos (PGL) glicopeptidolipidos (GLP) y lipooligosacáridos (LOS) <sup>(10)</sup>

El *PGL* tiene una porción sacarídica altamente inmunogénica y esta presente en las cepas patógenas de micobacterias. Estas moléculas le proporcionan propiedades antigénicas en la cápsula de *M. tuberculosis* y se asocian con la patogénesis de la TB, razón por la que se utilizan en el serodiagnóstico de la enfermedad <sup>(18-22)</sup>

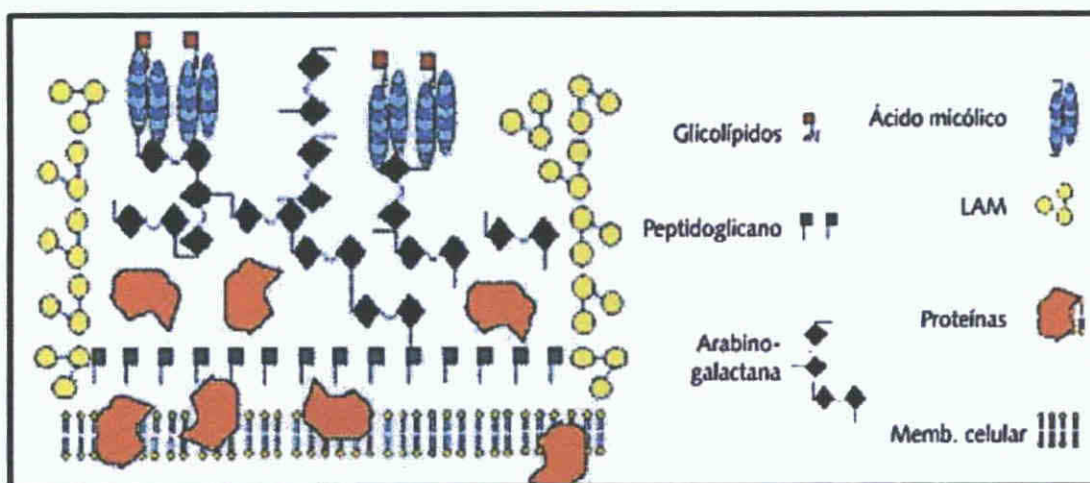
Los *GLP* son antígenos muy abundantes en la cápsula, presentan diferencias antigénicas entre especies de micobacterias. Están compuestas por moléculas de fenol tiocerol esterificado con dos ácidos grasos multiramificados (micocerósico o tioceránico) y a diferencia de todos los anteriores, los residuos sacarídicos están O metilados y asociados a la morfología lisa de algunas cepas de micobacterias y tienen un papel importante en la supervivencia intracelular de las micobacterias. Se ha observado *in vivo* e *in vitro* que los GLP inhiben la proliferación de células mononucleares estimuladas con mitógenos <sup>(18)</sup>

Los *lipooligosacáridos (LOS)* son aquellos constituidos por ácidos grasos de cadena larga con un núcleo sacarídico de poliácil trehalosa y un alto contenido de manosa. La cantidad y tipo de residuos de carbohidratos dan lugar a una variedad de LOS capsulares con diferencias antigénicas <sup>(10)</sup>

Estas diferencias en los residuos sacarídicos tienen valor taxonómico y diagnóstico. <sup>(17)</sup>

**Figura 1**

**Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis***



Tomado de Gorocica P y cols. <sup>(131)</sup>

### 1.3.1.1 Componentes con alto contenido de Manosa

*Lipoarabinomanana (LAM)* es un factor de virulencia lipoglycan e importante en la bacteria del género *Mycobacterium*. Además de servir como un importante componente de la pared celular, se piensa sirve como una modulina con efectos inmunorreguladores y anti-inflamatorios. Esto permite mantener la supervivencia de la bacteria en el reservorio humano al socavar la resistencia del huésped y la respuesta inmune adquirida. Las funciones adicionales de *LAM* se cree que incluyen la neutralización de los radicales libres de oxígeno citotóxicos producidos por los macrófagos, la

**inhibición de la proteína quinasa C y la inducción de genes de respuesta temprana <sup>(23)</sup>**

***LAM* se sintetiza mediante la adición de residuos de manosa a fosfoinositol por una serie de manosiltransferasas para producir fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y lipomannan (LM). PIM y LM son entonces glicosilados con arabinano para formar LAM. LAM se sabe tiene tres dominios estructurales principales. Estos incluyen un anclaje de glicosilfosfatidil que une la molécula a la pared celular, un núcleo D manano que sirve como un esqueleto de hidratos de carbono y un terminal D arabinano. Muchas cadenas laterales arabinofuranosil ramifican el núcleo de manosa. Las modificaciones covalentes a este terminal D arabinano crean diversas estructuras LAM con sus propias funciones únicas para mediar la supervivencia bacteriana dentro de un huésped. La presencia y la estructura de la nivelación permiten una clasificación de moléculas de LAM en tres clases principales: ManLAM, PILAM y AraLAM <sup>(23)</sup>**

***LAM manosilada (ManLAM)* se caracteriza por la presencia de tapones manosilo en el terminal D arabinano. Estos tipos de modelos de área limitada se encuentran más comúnmente en más especies patógenas tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis*. ManLAM ha demostrado ser una molécula antiinflamatoria que inhibe la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 por las células dendríticas y macrófagos humanos *in vitro***

para modular la apoptosis inducida por macrófagos mediante la unión a receptores de manosa. <sup>(23)</sup>

**PILAM** son LAMs cubiertos con fosfoinositol y se encuentran típicamente en las especies no patógenas como *M smegmatis*. En contraste con ManLAMs, PILAMs son pro inflamatorias. CD14, un receptor presente en el reconocimiento por macrófagos asociado con Toll like receptor 2, se describe como un receptor para PILAM. La unión de PILAM al receptor provoca la activación de una cascada de señalización intracelular que activa los factores de transcripción que inician la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias, induciendo a TNF  $\alpha$ , IL 8, IL 12 y la activación y apoptosis de los macrófagos. <sup>(23)</sup>

**AraLAM** se caracteriza por cadenas laterales 1,3 manosilo en lugar de la 1,2 que se encuentra comúnmente en otras especies de micobacterias. Ciertas especies de bacterias de crecimiento rápido, como *M chelonae* y cepas de laboratorio, contienen modelos de área limitada que están ausentes de las dos capas de manosa y phosphoinosital. Estas formas se consideran más potentes que la ManLAM manosa-capsulado en la inducción de las funciones asociadas con la activación de macrófagos. Además de la estimulación de los genes tempranos tales como c fos, KC y JE, AraLAM induce la transcripción del ARNm para citoquinas característicamente producidos por los macrófagos. Proto oncogenes c fos y c myc están involucrados en la

regulación de la transcripción génica, mientras que JE y KC son citoquinas peptídicas que sirven como quimioatrayentes específicos para los neutrófilos y los monocitos. La activación de TNF crea manifestaciones patológicas de la enfermedad, tales como la necrosis del tejido, daño a los nervios y la inmunidad protectora. Grupos O acilo de la fracción de arabinomano pueden ser responsables de la actividad de TNF inductor que causa los síntomas de fiebre, pérdida de peso y necrosis. Sin embargo, la presencia de ManLAMs disminuye la actividad de AraLAM y la supresión de una respuesta inmune.<sup>(23)</sup>

### **1.3.1.2 Componentes ricos en Arabinosa y Galactosa**

El *disacárido arabinogalactano (AG)* es un antígeno presente en varias macromoléculas de bacterias taxonómicamente relacionadas. En las bacterias del orden de los actinomicetales como las micobacterias, representa cerca del 35% de la composición de la pared celular.<sup>(24)</sup> AG está compuesta por los azúcares D galactofuranosa y D arabinofuranosa, que son raros en la naturaleza.

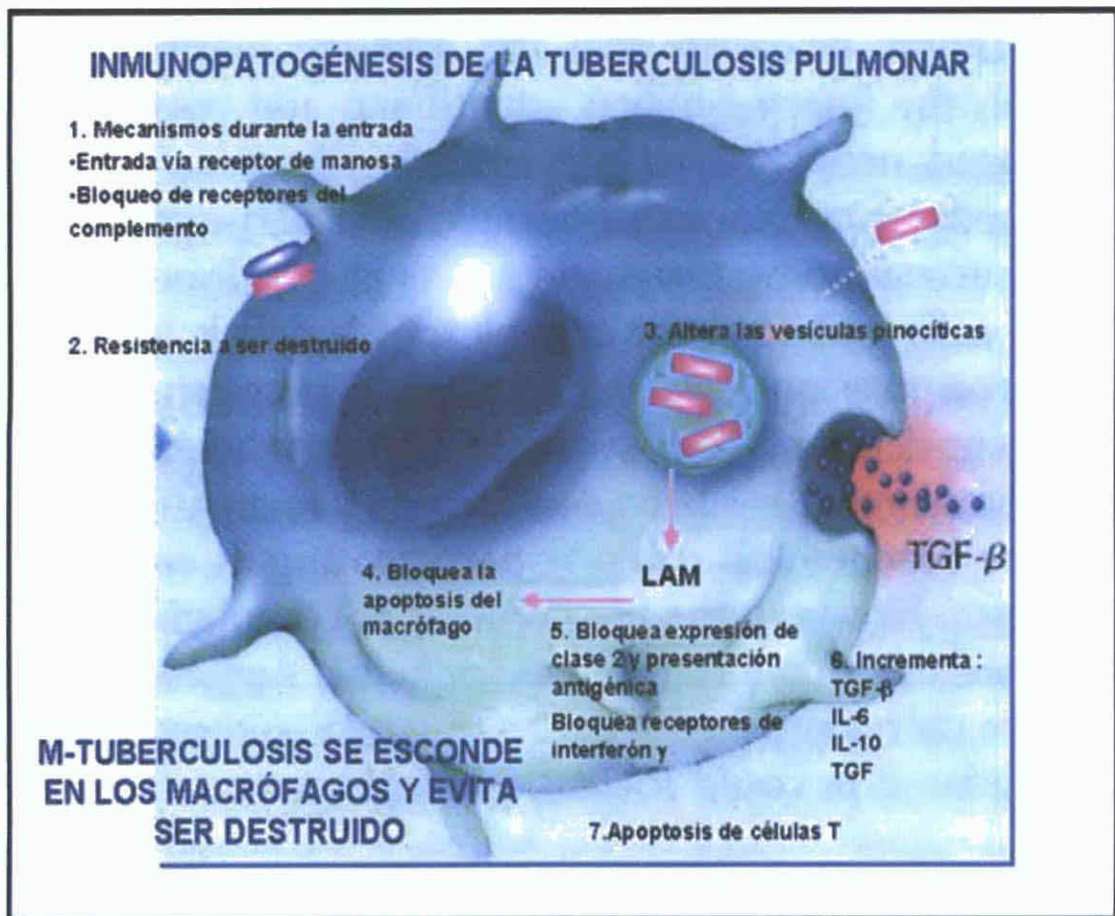
El *peptidoglicano (PG)* es una capa rígida que confiere resistencia a la presión osmótica interna y actúa de soporte para otras moléculas de la pared celular. El PG está compuesto, al igual que en otras bacterias, por unidades de N acetil glucosamina (NAG) y de N acetilmurámico (NAM), aunque presenta gran cantidad de residuos de N glicolil murámico. Los residuos de



NAM están unidos a una cadena peptídica formada por alanina (Ala), glutámico (Glu) y ácido meso-diaminopimélico (DAP) (L-Ala-D-Glu-DPA-D-Ala). Los enlaces interpeptídicos más frecuentes se dan entre DAP y D-Ala. Algunas enzimas que participan en la biosíntesis del complejo se han inhibido con fármacos como la fosfomicina. El estudio de estas enzimas es importante para el desarrollo de nuevos fármacos contra micobacterias.

**Figura 2**

**Inmunopatogénesis de la Tuberculosis pulmonar**



Tomado del V Congreso virtual Hispanoamericano de anatomía patológica. (<http://conganat.uninet.edu/conferencias/C013/>)

#### **1.4 Genoma de *Mycobacterium tuberculosis***

En 1998 se publicó el genoma completo de MTB concretamente de la cepa de laboratorio H37Rv. El genoma posee 4 411 529 pares de bases que incluyen genes de la virulencia, patogénesis, supervivencia, latencia y posibles genes dianas para la acción de fármacos.<sup>(25)</sup>

Se estima que el genoma de MTB tiene un contenido importante en citosina/guanina (65.5%) relativamente constante a lo largo de toda la secuencia, alberga alrededor de 4000 genes (3924 ORFs identificados). Llama la atención la elevada proporción de genes que codifican para la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis. De hecho pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como MTB y destaca el hecho de que el genoma codifique incluso para sistemas enzimáticos de biosíntesis lipídica propios de plantas y de mamíferos. Si se compara el número de enzimas implicados en el metabolismo de los ácidos grasos de *E. coli* versus MTB contrasta los 50 de *E. coli* frente a los 250 genes de MTB. Es importante destacar que la mayor parte de los genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos están destinados a la lipólisis más que a la lipogénesis. En efecto, la degradación de lípidos propios de las membranas celulares o vacuolares del huésped, resulta decisiva para la patogenia, así como para la obtención de energía.<sup>(25)</sup>

El hecho de que la proporción C/G sea elevada a lo largo de todo el genoma, en forma homogénea y no concentrada en regiones puntuales denota que se trata de un genoma que no ha recibido el impacto de la transferencia horizontal de islas de patogenia. No obstante se observan regiones con una proporción de C/G superior a la media y que son secuencias pertenecientes a una gran familia de genes que incluyen PGRSs (polymorphic G+C rich sequences) <sup>(25)</sup>

Por otro lado el genoma de MTB difiere del resto de las bacterias por poseer dos nuevas familias de proteínas ricas en glicina, cuya estructura repetitiva proporciona una fuente importante de variabilidad antigénica. Se calcula que un 10% de la capacidad codificante de MTB está destinada a esta familia multigénica, cuyos genes se hallan organizados en forma de *cluster*. Es un genoma rico en ADN repetitivo especialmente en forma de secuencias de inserción como la *IS6110* de la que se han hallado 16 copias pero también son fuentes de repetición las nuevas familias multigénicas y genes *housekeeping* duplicados. Pese a que la tasa de duplicación es similar a la de otros microorganismos (el 51% de sus secuencias codificantes han surgido a partir de un proceso de duplicación) como *E. coli* o *B. subtilis* difiere respecto a ellos en el hecho de que el grado de conservación es considerablemente superior es decir al proceso de duplicación no le ha seguido un fenómeno de divergencia, lo cual constituye una evidencia más

que confirma la hipótesis de que *M. tuberculosis* ha surgido de un proceso de especiación relativamente reciente o bien que se halla ante un cuello de botella.

Los 3924 ORFs identificados suponen un 91% de capacidad codificante del genoma, esto es una densidad alta. El 40% de los ORFs predichos se les ha atribuido una función precisa por comparación con secuencias depositadas en bases de datos en Genbank. Un 44% son secuencias con similitud o información relacionada. El 16% restante alberga genes de función desconocida, entre los que se deben encontrar genes con funciones específicas de *Mycobacterium* <sup>(25)</sup>

En cuanto a la composición aminoacídica, los datos guardan coherencia con el contenido elevado en guanina/citosina, en efecto predominan aminoácidos del tipo alanina, glicina, prolina, arginina y triptófano puesto que son los codificados por codones ricos en G/C frente a unos aminoácidos menos representados como son la asparagina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina. <sup>(25)</sup>

Dos nuevas familias de proteínas las PE (motivos Pro Glu a nivel del extremo N terminal) y las PPE (Pro Pro-Glu) se caracterizan precisamente por ser ricas en glicina, y su elevado grado de polimorfismo hace pensar en ellas como potenciales antígenos. El hecho de que se les atribuya un papel

inmunológico no sólo se debe a la importante fuente de variación (antigénica) que suponen sino porque se cree que podrían interferir en la respuesta inmune via inhibición del procesamiento antigénico tan necesario para la presentación de antígeno posterior <sup>(25)</sup>

La familia PE por ejemplo se compone de 90 miembros que comparten un dominio en el extremo N terminal muy conservado consistente en 110 residuos aminoácidos que se disponen dando lugar a una estructura globular mientras que el extremo C terminal varía en secuencia, longitud y número de repeticiones. Estudios filogenéticos han llevado a subdividir la familia en distintos grupos siendo el más numeroso el de las PGRS cuyo contenido en glicina supera el 50% y se distribuye en forma de repeticiones en tándem del motivo Gly Gly Ala/Asn. Existe cierto paralelismo entre las proteínas PGRS y los antígenos del virus nuclear Epstein Barr (EBNAS). Los EBNAS actúan bloqueando la acción del proteosoma, impidiendo así la presentación de antígenos de clase I <sup>(25)</sup>

Al completar la secuencia del genoma de *M tuberculosis* se abre una prometedora puerta que nos permite pensar en nuevos tratamientos a la hora de luchar contra la epidemia emergente de la que son responsables un número cada vez mayor de cepas multiresistentes <sup>(25)</sup>

## **2 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS**

El contagio con MTB se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares. Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos. Al evaporarse queda tan sólo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas. Las partículas de tamaño superior a 10µm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5µm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadena la primoinfección <sup>(26)</sup>

Otras posibles vías de contagio han dejado de tener importancia epidemiológica. Tal es el caso de la transmisión digestiva por la leche de vacas enfermas (*Mycobacterium bovis*) controlada gracias al procedimiento de pasteurización sistemático de la leche.

En la mayoría de las ocasiones los escasos bacilos que llegan hasta los alveolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos. Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad la mitad de ellos tempranamente a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces de varias décadas) para que se produzca la reactivación.

endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables <sup>(26)</sup>

La aspiración de *M tuberculosis* hasta los alveolos desencadena una serie de respuestas tisulares e inmunológicas conocidas como primoinfección tuberculosa. En primer lugar se produce un foco de alveolitis exudativa los macrófagos eliminan un determinado número de micobacterias y si la invasión no ha sido masiva, muchas veces no se pasa esta fase local. Cuando la infección se propaga por las vías linfáticas intrapulmonares hasta los ganglios regionales paratraqueales o mediastínicos da lugar al llamado complejo bipolar (foco pulmonar y adenopatías). En esta fase es habitual que se produzcan pequeñas diseminaciones bacilares por vía hematogena a los segmentos apicales pulmonares riñones hígado y huesos que por lo general suelen controlarse localmente y que no tienen trascendencia clínica alguna. En las 2-10 semanas posteriores a la infección se pone en marcha una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. Los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para que estimulen mediante liberación de linfocinas la transformación de un gran número de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epiteliales y gigantes de Langhans).

Los linfocitos activadores de los macrófagos las células epiteloides y las gigantes se sitúan concéntricamente para rodear e intentar destruir a los bacilos intrusos dando lugar al característico granuloma tuberculoso que al cabo de un tiempo se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa. En muchos casos este sistema defensivo controla totalmente la infección y una vez cumplido su cometido se reabsorbe dejando tan sólo una pequeña cicatriz fibrosa que para mayor seguridad acostumbra a calcificarse. En estas circunstancias es posible que la primoinfección haya sido asintomática y que incluso no deje secuelas detectables en la radiografía de tórax lo que sí queda es la memoria inmunológica que se pondrá de manifiesto con la prueba de la tuberculina y permitirá diferenciar los individuos infectados (tuberculina positivos) de los no infectados (tuberculina negativos) <sup>(26)</sup> Así pues según el balance inicial entre el sistema inmunitario del huésped y las micobacterias tuberculosas se distinguen tres situaciones diferentes: exposición sin infección, infección sin enfermedad o estado de latencia y enfermedad activa (Figura # 3).

## **2.1 Exposición sin infección**

Esta condición no desarrolla respuesta inmunitaria (reacción de la tuberculina negativa) no hay evidencia de enfermedad.



## **2 2 Infección latente**

En cualquier área donde el bacilo se localice provocará una reacción inflamatoria que constituye el chancro de inoculación habitualmente pulmonar y mucho menos frecuentemente digestivo cutáneo o mucoso. Alrededor del bacilo se agrupan una serie de células mononucleadas linfocitos y macrófagos con algunas células gigantes (células de Langhans). El centro de este folículo o granuloma suele necrosarse y luego se calcifica. En la mayoría de los casos se produce la destrucción de las micobacterias y la única evidencia de infección es un test cutáneo de hipersensibilidad a la tuberculina positivo y otras veces los bacilos pueden persistir en forma latente. En una minoría de casos los antígenos en el complejo primario (foco pulmonar inicial más el ganglio linfático regional) alcanzarán una concentración suficiente de hipersensibilidad que resultaría en una necrosis y calcificación visible radiológicamente. Junto con el desarrollo de hipersensibilidad pueden asociarse manifestaciones alérgicas como eritema nodoso o queratoconjuntivitis flictenular. La mayoría de estos casos quedan en esta primoinfección que da lugar a la alergia tuberculínica y a la inmunidad tuberculosa que provoca un estado defensivo en el organismo hacia nuevas infecciones o a la diseminación de la infección en curso. Esta inmunidad fallará bajo alguna circunstancia que produzca inmunodepresión provocando una enfermedad tuberculosa meses o años después de la

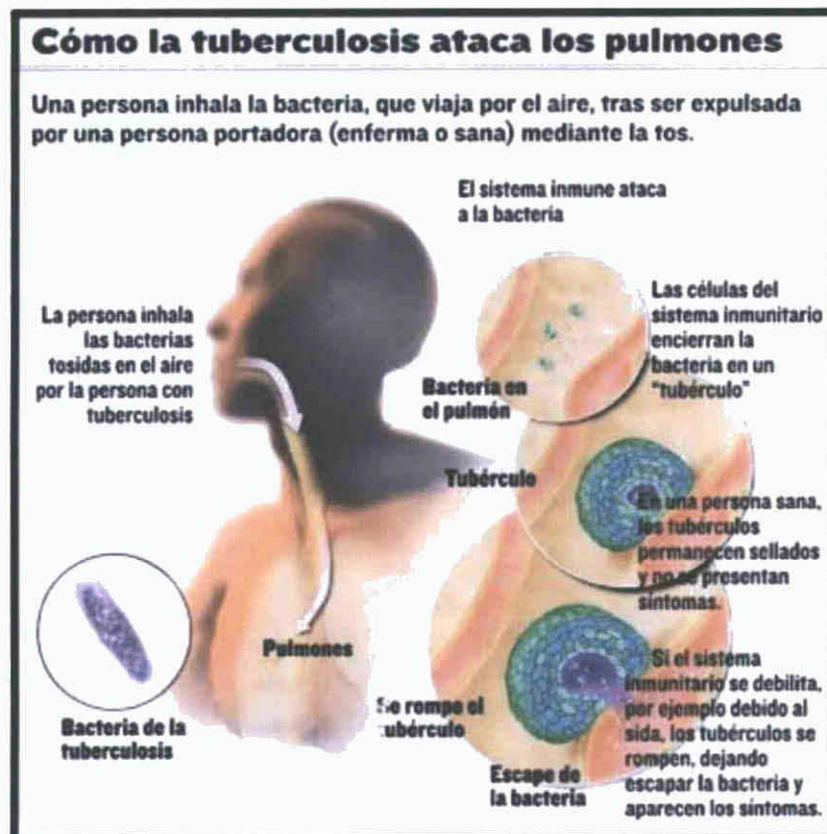
**infección por el mismo bacilo reinfeksi3n end3gena o por reinfeksi3n ex3gena (adquisici3n de un nuevo bacilo del exterior)**

### **2 3 Enfermedad**

**Se manifiesta por un gran polimorfismo con variadas localizaciones ya sean pulmonares o extrapulmonares (menos frecuentes) La tuberculosis pulmonar puede ser aguda, neum3nica o bronconeum3nica Puede provocar una diseminaci3n hemat3gena con afectaci3n miliar o meningea, as3 como tambi3n complicaci3n bronquial debido a adenopatias mediastinales que pueden ocasionar atelectasias por comprimir el 3rbol bronquial Las bacterias de la tuberculosis se activan si el sistema inmunitario no puede detener su crecimiento Cuando las bacterias de la tuberculosis est3n activas (multiplic3ndose en el cuerpo de la persona) se le denomina enfermedad de la tuberculosis Las personas enfermas de tuberculosis pueden tambi3n transmitir las bacterias a otras personas En muchas personas la infecci3n de tuberculosis latente nunca se convertir3 en la enfermedad Algunas personas se enferman de tuberculosis poco despu3s de contraer la infecci3n (en las semanas siguientes) antes de que las defensas del sistema inmunitario puedan combatir a las bacterias Otras personas se enferman a3os despu3s cuando su sistema inmunitario se debilita por otras causas Para las personas con sistemas inmunitarios debilitados especialmente las que tienen la**

infección por el VIH, el riesgo de enfermarse de tuberculosis es mucho mayor que las personas con sistemas inmunitarios normales.

**Figura 3**  
**PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS**



Tomado de: <http://www.tuberculosis.pe/content/infografia-ataca-tuberculosis>

**Tabla 1**  
**DIFERENCIAS ENTRE LA INFECCIÓN DE TUBERCULOSIS**  
**LATENTE Y LA ENFERMEDAD DE TUBERCULOSIS <sup>(27)</sup>**

Una persona con la infección de tuberculosis latente	Una persona con la enfermedad de tuberculosis
No tiene ningún síntoma	Presenta síntomas que pueden incluir <ul style="list-style-type: none"> <li>○ tos intensa que dura 3 semanas o más</li> <li>○ dolor en el pecho</li> <li>○ tos con sangre o esputo</li> <li>○ debilidad o fatiga</li> <li>○ pérdida de peso</li> <li>○ falta de apetito</li> <li>○ escalofríos</li> <li>○ fiebre</li> <li>○ sudores nocturnos</li> </ul>
No se siente mal	Por lo general, se siente mal
No puede transmitir las bacterias de la tuberculosis a otras personas	Puede transmitir las bacterias de la tuberculosis a otras personas
Por lo general, el resultado de la prueba cutánea o de la prueba de sangre indica que tiene una infección por tuberculosis	Por lo general, el resultado de la prueba cutánea o de la prueba de sangre indica que tiene una infección por tuberculosis
Presenta una radiografía de tórax normal y un resultado negativo al frotis de esputo	Puede tener una radiografía de tórax anormal y un resultado positivo al frotis o el cultivo de esputo
Necesita tratarse la infección de tuberculosis latente para evitar que se convierta en enfermedad de tuberculosis	Necesita tratarse la enfermedad de tuberculosis

### 2.3.1 Manifestaciones clínicas de la Enfermedad

La tuberculosis posprimaria, también conocida como secundaria o tuberculosis de tipo adulto es la forma clínico radiográfica más frecuente aunque en general el individuo no tiene constancia de la primoinfección previa por las características de ser asintomática o poco aparente

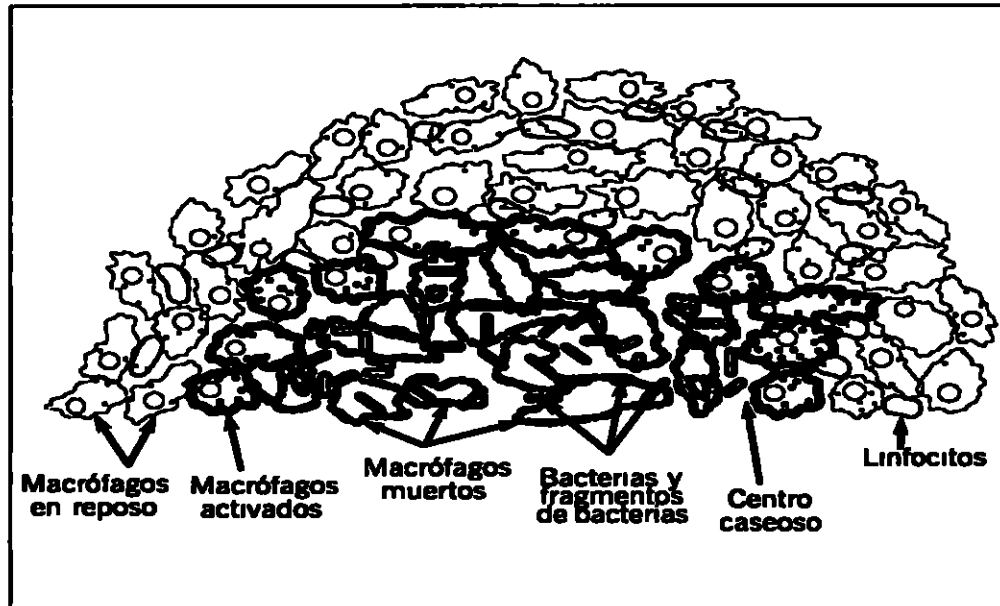
En algunos casos sobre todo en los países con alta prevalencia de tuberculosis la tuberculosis posprimaria se debe a una reinfección exógena pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante lo más común es la reinfección endógena por micobacterias latentes capaces de resistir en el interior de algunas células o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas en un continuo equilibrio con las defensas orgánicas que se rompe tras muchos años por alteraciones transitorias o persistentes de la inmunidad.

De cualquier forma, la respuesta será distinta en el individuo reinfectado que en el previamente sano como ya puso de manifiesto Koch con un clásico experimento: si se inocula a un cobayo sano bacilos de MTB por vía subcutánea, se forma en el punto de inoculación un absceso que posteriormente se ulcera, se infartan los ganglios linfáticos regionales y al cabo de pocas semanas el animal muere por diseminación generalizada de la tuberculosis. Si esta misma experiencia se realiza en un animal con previa exposición a tuberculosis en lugar de una ulcera se forma una escara que cicatriza, no aparecen adenopatías y el animal no muere: es decir que si sobrevive a la primera infección es capaz de presentar un cierto grado de resistencia frente a posteriores agresiones lo que le permite al menos localizar la enfermedad e impedir su diseminación. Esto explica, en gran parte, las diferentes características de la primoinfección y de la tuberculosis posprimaria en el hombre. <sup>(26)</sup>

### **3 TRATAMIENTO**

Antes que existieran drogas efectivas la mitad de los pacientes con tuberculosis pulmonar morían en 2 años y sólo 25% se curaban. Con el advenimiento de la quimioterapia los tratamientos con largos periodos de reposo en cama, aislamiento prolongado y colapsoterapia, se tornaron innecesarios. El tratamiento de la tuberculosis se basa en conceptos muy distintos a los de las demás infecciones bacterianas. MTB tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en periodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos <sup>(28)</sup>. Respecto al tratamiento existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad (Figura 4). Así los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; los del interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente microaerofílico que induce la latencia, y los que se encuentran en el interior del *caseum* tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). Por otra parte MTB puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil, o bien encontrarse en cavidades pulmonares puras o material caseoso, en donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil. Finalmente hay que señalar que el pH del material caseoso y el del interior de los macrófagos es muy bajo, lo cual condiciona la actividad de los distintos fármacos <sup>(29)</sup>.

**Figura 4**



**Figura 4** Representación esquemática de la estructura de un foco caseoso  
Tomado de Bentrup y Russell

Los fármacos antituberculosos presentan un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones (Figura 4) y es necesario asegurarse de que el tratamiento prescrito sea activo frente a todas ellas

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos. Considerando además que aunado a la resistencia natural se ha identificado la resistencia primaria y la resistencia secundaria, como se describe a continuación

- **Resistencia natural** Aparece sin que la cepa bacteriana haya estado expuesta al fármaco. Es causada por mutaciones que ocurren al azar en poblaciones bacterianas numerosas. Para evitarla se utilizan varios

fármacos por lo improbable de la aparición de resistencia natural a más de un fármaco

- **Resistencia Primaria** Es cuando la infección se produce por el contagio con un bacilo que ya era resistente al antimicrobiano Es causada por la diseminación de bacilos resistentes Para evitarla se crean medidas higiénicas que eviten la diseminación de bacilos resistentes a partir de enfermos sin tratar o en el transcurso del tratamiento
- **Resistencia Secundaria** Se desarrolla en bacilos que son sensibles al inicio y se vuelven resistentes durante el tratamiento Es causada por monoterapias tratamientos inadecuados tratamientos incompletos Para evitarla se emplean varios fármacos La multiterapia reduce la posibilidad de que aparezcan mutantes

Como *Mycobacterium tuberculosis* posee una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos el tratamiento de la tuberculosis se realiza con antimicrobianos específicos (con actividad antituberculosa) <sup>(30)</sup>

### **Fármacos de Primera Línea**

La tuberculosis tiene un tratamiento eficaz que asegura, en los casos no complicados una tasa de curación superior al 95% El éxito de este



tratamiento se basa en la asociación de fármacos y en su larga duración isoniacida (hidracina del ácido isonicotínico INH) rifampicina (RIF) y piracinamida (amida del ácido pirocínico PZA) los primeros <sup>(31)</sup> meses e INH y RIF hasta completar los 6 meses de tratamiento <sup>(32, 33)</sup> Debe añadirse un cuarto fármaco en aquellas zonas con una incidencia de resistencia primaria a la INH superior al 4% cuando el paciente ha sido previamente tratado con antimicobacterianos cuando el paciente es de un país con una elevada incidencia de tuberculosis resistente o cuando existe el antecedente de contacto con un paciente con tuberculosis resistente conocida Este cuarto fármaco sería etambutol (ETB) para los adultos y estreptomina (STR) para los niños en quienes no es posible monitorizar la agudeza visual Los fármacos mencionados se conocen como fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis <sup>(34)</sup>

#### ***Isoniacida (INH)***

La INH es activa tan sólo frente a los bacilos en replicación activa, siendo su papel muy limitado en las poblaciones que replican lentamente como las del caseum o en las poblaciones latentes como las del interior de los macrófagos <sup>(34)</sup>

#### ***Rifampicina (RIF)***

RIF tiene un efecto bactericida sobre las células de *M tuberculosis* metabólicamente activas y también posee una excelente acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia (que sólo presentan ocasionalmente

actividad metabólica) tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos <sup>(34)</sup>

#### ***Piracinamida (PZA)***

Es un derivado sintético de la nicotinamida. Posee un potente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes en el interior de los macrófagos que permite cuando se usa asociada a la RIF acortar a 6 meses el tratamiento de la tuberculosis sensible. Pero carece de actividad frente a las demás micobacterias incluyendo otros componentes del complejo tuberculosis <sup>(34)</sup>

#### ***Etambutol (EMB)***

Etilen-diamino-dibutanol es un producto isomérico dextrógiro derivado de la etilendiamina. Es activo frente a células en crecimiento activo. Tiene una actividad variable sobre las demás especies de micobacterias de crecimiento lento y su actividad es mucho menor en las especies de crecimiento rápido. Inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana <sup>(34)</sup>

#### ***Estreptomina (STR)***

La STR es un antibiótico aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica. Activo frente a bacilos extracelulares <sup>(34)</sup>

## **Fármacos de Segunda Línea**

Existen también otros fármacos de segunda línea o de reciente desarrollo que constituyen como veremos alternativas para el tratamiento en determinadas situaciones en donde el paciente presenta resistencia a los fármacos de primera línea, principalmente a INH y RIF que son las dos drogas más importantes para en el tratamiento antifímico. Un paciente resistente a INH y RIF es considerado multi droga resistente (MDR) y requiere de un esquema de tratamiento con fármacos de segunda línea, más costosos con más efectos secundarios y con una duración más extendida del tratamiento <sup>(34)</sup> Algunos de estos fármacos son

### ***Etionamida (ETH)***

La etionamida (Etil tio-isonicotinamida) y la protionamida (propil tio isonicotinamida) son derivados del ácido isonicotínico con una potente actividad frente a *M. tuberculosis* y otras micobacterias. La ETH inhibe la síntesis de ácidos micólicos y estimula las reacciones de oxidorreducción. Su mecanismo de acción es parecido al de la INH. Por consiguiente las mutaciones en el gen *inhA* que confieren una resistencia de bajo nivel a la INH también producen resistencia a la ETH <sup>(35)</sup>

### ***Amicacina kanamicina capreomicina y viomicina***

La amicacina y la kanamicina, junto con la estreptomina, son aminoglucósidos similares estructuralmente y poseen actividad antituberculosa. La capreomicina y la viomicina son antimicrobianos

peptídicos básicos que comparten el mecanismo de acción con los aminoglucósidos. No se absorben por vía oral siendo de administración intramuscular.

### ***Cicloserina***

La D cicloserina (4-amino-3-isoxazolidinona) es un análogo de la D-alanina que inhibe de forma competitiva, las enzimas D-alanil-D-alanina sintetasa, alanina racemasa y alanina permeasa, interfiriendo con la síntesis de la pared micobacteriana.<sup>(36)</sup> Es activa frente a todas las micobacterias así como frente a otros microorganismos.

### ***Fluoroquinolonas***

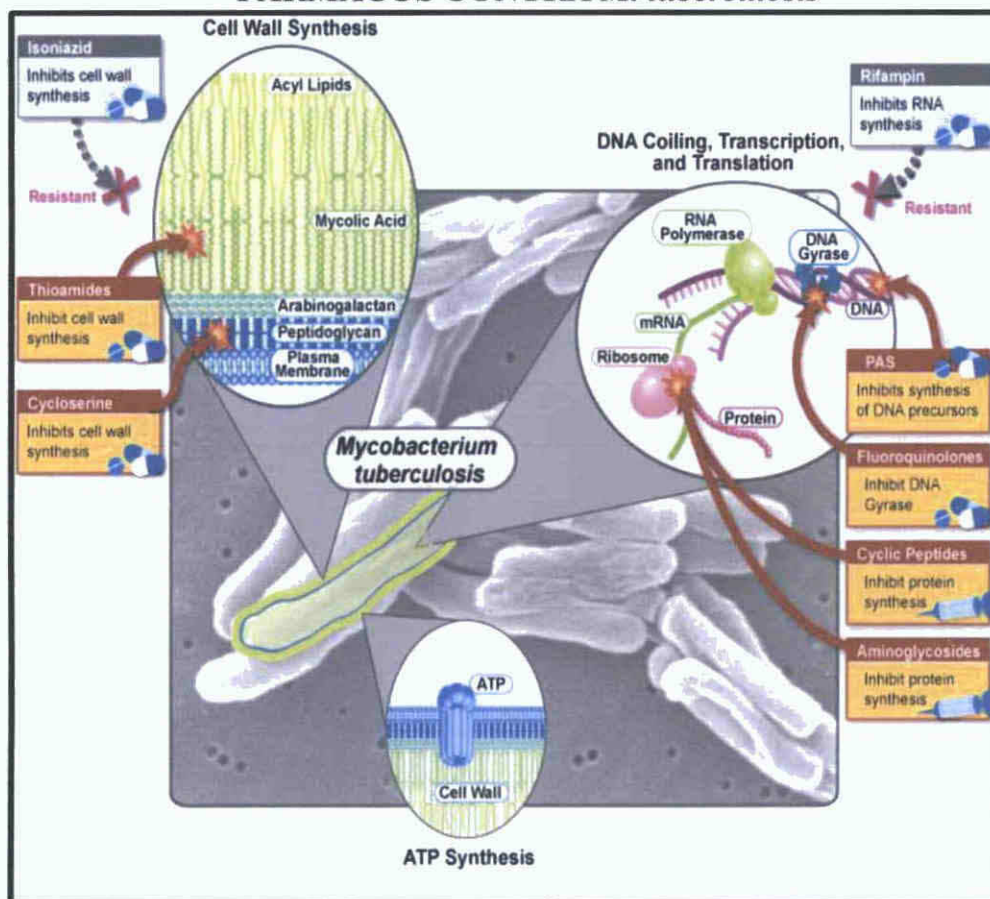
La actividad de las quinolonas tiene lugar a nivel de las topoisomerasas de tipo II y fundamentalmente sobre la ADN girasa compuesta de dos subunidades A y dos subunidades B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* respectivamente.

### ***Ácido paraaminosalicílico (PAS)***

PAS es activo frente a *M. tuberculosis* mientras que las demás micobacterias son resistentes. Es activo frente a la población de crecimiento extracelular. El mecanismo de acción del PAS no se conoce con exactitud. Se le ha atribuido inhibición de la síntesis de ácido fólico, del metabolismo del ácido salicílico y del transporte de hierro.

La paradoja del tratamiento de la tuberculosis es que cuando se cumplen 50 años de la introducción de una quimioterapia eficaz, el número de casos de la enfermedad a escala mundial es mayor y lo que es más alarmante aumenta el número de infecciones por cepas resistentes a los fármacos antituberculosos. Un tercio de la población mundial está infectada aproximadamente existen 9 millones de nuevos casos de la enfermedad por año y 2.5 millones de muertes <sup>(37-38)</sup>. A esta situación han contribuido la pandemia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) <sup>(39)</sup> la reducción de la financiación de los programas de control de la enfermedad, los movimientos migratorios a partir de países con gran incidencia de tuberculosis y el incremento de la incidencia de cepas multiresistentes <sup>(40-41)</sup>.

**Figura 5**  
**FARMACOS CONTRA *M. tuberculosis***



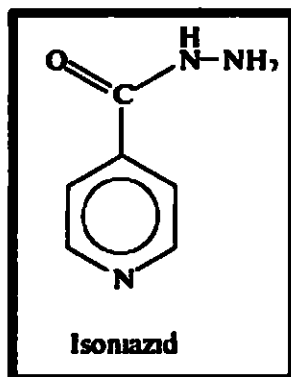
Tomado de Curiosidades de la Microbiología (<http://curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com/2012/03/como-buscar-nuevos-objetivos-para-un.html>)

### **3 1 Mecanismo de acción y mecanismo de resistencia de los dos principales fármacos del tratamiento antifímico Isoniacida y Rifampicina**

#### **3 1 1 Isoniacida**

##### **3 1 1 1 Mecanismo de acción de la Isoniacida**

Desde que se conoció la actividad clínica de la isoniácida (forma hidracida del ácido isonicotínico INH) por Robitzek y Selikoff en 1952 <sup>(42)</sup> ha sido la droga más comunmente utilizada contra *Mycobacterium tuberculosis* La INH está conformada por un anillo de piridina y un grupo hidrazida (Figura 6) Y es un análogo de nicotinamida estructuralmente relacionado a otras drogas antifímicas como la etionamida y pirazinamida <sup>(43)</sup>



**Figura 6**

#### **Estructura química de la Isoniacida**

Por su potencia y actividad bactericida forma parte del esquema de drogas de primera línea contra *M tuberculosis* Sin embargo la resistencia a INH

ha sido reportada con una incrementada frecuencia, con las tasas más elevadas en el sudeste de Asia y la Federación Rusa <sup>(44 45)</sup>

INH parece penetrar con facilidad las células del hospedero <sup>(46 47)</sup> y difundirse a través de la membrana de *M tuberculosis* <sup>(48 49)</sup> La INH es una pro-droga y requiere de una activación oxidativa por la enzima catalasa peroxidasa codificada por el gen *katG* en *M tuberculosis* Aunque se ha reportado que los metabolitos activos de INH inhiben múltiples vías celulares esenciales incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos <sup>(50)</sup> y fosfolípidos <sup>(51)</sup> parece que la principal ruta inhibida es la síntesis de ácidos micólicos <sup>(52, 53)</sup>

Los ácidos micólicos son ácidos grasos ramificados de cadena muy larga (hasta 90 átomos de carbono) constituyen uno de los componentes principales de la envoltura de la célula micobacteriana y contribuyen en gran medida a su impermeabilidad De los casi 4000 genes que conforman el genoma de *M tuberculosis* llama la atención la elevada proporción de su capacidad codificante destinada a la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis Pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como *M tuberculosis*

Uno de los genes presente dentro del cromosoma de este patógeno (así como también de otras especies de micobacterias) codifica para una enzima que contiene todos los dominios funcionales requeridos para la síntesis de ácidos grasos denominada sintetasa de ácidos grasos de tipo I o FASI (Fatty Acid



Synthase I) Lo llamativo de la presencia de esta enzima en micobacterias es que es la misma que sintetiza ácidos grasos en eucariotas desde la levadura *S. cerevisiae* hasta el ser humano (55 56 57 58 59)

### **3.1.1.2 Genes involucrados en los mecanismos de resistencia a isoniazida**

#### ***Gen inhA***

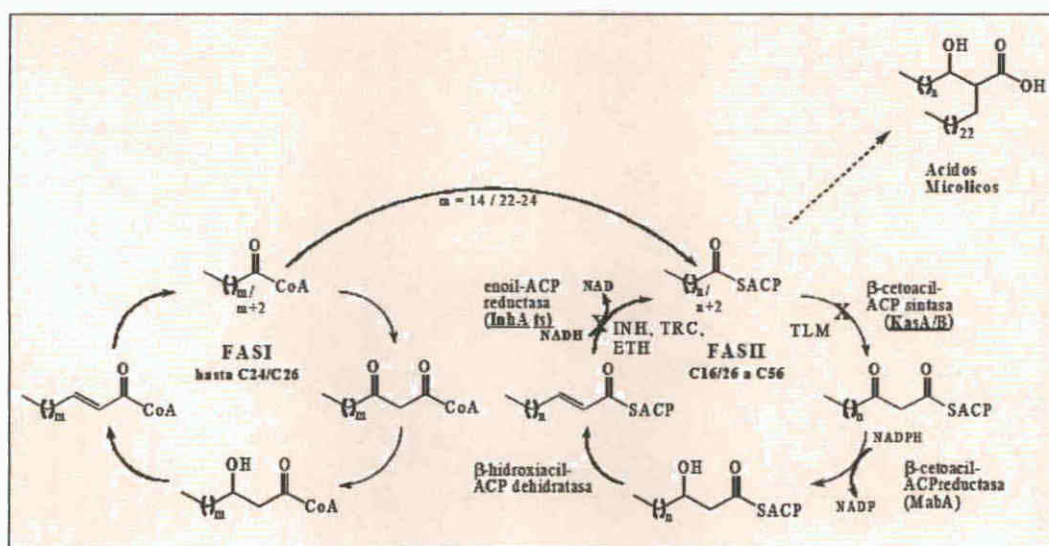
La identificación del blanco de acción de INH en micobacterias fue realizada, en su mayor parte por el grupo de W. R. Jacobs y contribuyó no solamente a aclarar el mecanismo de acción de la INH sino también a comprender la ruta biosintética de los ácidos micólicos. El grupo de Jacobs aisló cepas mutantes de la micobacteria no patógena de crecimiento rápido *M. smegmatis* resistentes a INH, y clonó e identificó el gen responsable. Este gen también presente con alto grado de homología en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG fue denominado *inhA* y se vio que mostraba gran similitud con el gen *fabI* de *E. coli* involucrado en la síntesis de ácidos grasos de bacterias mediada por FASII (Figura 7). Esta información adquiere relevancia si se recuerda que INH causa inhibición de la síntesis de los ácidos micólicos en micobacterias pero no afecta la síntesis de los ácidos grasos de cadena más corta producidos por FASI. Al mismo tiempo podría estar señalando la existencia de dicho sistema en micobacterias dado que *fabI* es parte de FASII. Esta posibilidad estaría sustentada por la necesidad de contar con un sistema de síntesis para los ácidos micólicos con lo cual las micobacterias

tendrían sistemas específicos para la síntesis de ácidos grasos "normales" (necesarios para la síntesis de membrana citoplasmática) y "extra-largos".

La secuenciación del gen mutado en cepas de *M. smegmatis* INH<sup>R</sup> mostró que el cambio del aminoácido Serina 94 por Alanina (Ser94Ala) era el responsable de la resistencia a INH. Asimismo se demostró que esta cepa mutante presentaba resistencia cruzada a la droga antifimica de segunda línea etionamida<sup>(60)</sup>, la que también actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos<sup>(61)</sup>. Sin embargo, numerosos aislamientos clínicos resistentes a isoniácida (INH<sup>R</sup>) eran etionamida sensible (ETH<sup>S</sup>), lo que sugiere blancos distintos.

**Figura 7**

**Esquema de la ruta biosintética de los ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias**



Estudios llevados a cabo por Ortiz de Montellano y otros investigadores mostraron recientemente que la etionamida es también una prodroga activada por una monooxigenasa denominada EthA<sup>(62,63 64)</sup> y esto justificaria la proporción de aislamientos clínicos INH<sup>R</sup> ETH<sup>S</sup>. El hecho de que cepas clínicas mostraran resistencia tanto a INH como a ETH indicaba un mecanismo de resistencia compartido lo que fue confirmado al clonar y secuenciar el gen *inhA* en cepas INH<sup>R</sup> *katG* (+) y ETH<sup>R</sup> *ethA* (+). En todas las cepas analizadas se encontraron mutaciones en *inhA* que eran suficientes para impedir la unión de INH activado y ETH activado<sup>(65 66 67 68 69)</sup>. La identificación de *inhA* como blanco de acción de INH en micobacterias llevó a la secuenciación del gen *inhA* en numerosos aislamientos clínicos y se encontró que las mutaciones más frecuentes eran de dos tipos: 1) en la región promotora de *inhA* (este gen está ubicado corriente abajo del gen *mabA* con el cual forma un operón y 2) en la región codificante de *inhA*.

### **Gen *katG***

La resistencia a INH entre aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha estado asociada con pérdida de actividad de la enzima catalasa peroxidasa<sup>(70)</sup>. En general hay una relación inversa entre el grado de resistencia a INH y la actividad de la catalasa<sup>(71)</sup>. Zhang y colegas demostraron que la deficiencia en *katG* el cual codifica la enzima catalasa peroxidasa de *M. tuberculosis* está relacionada con la resistencia a INH en aislados clínicos de *M.*

*tuberculosis* <sup>(72,73)</sup> Mutaciones en *katG* reducen la capacidad de la enzima de activar la pro-doga INH lo que conduce a la resistencia El gen *katG* en *M tuberculosis* esta situado en una región altamente variable e inestable del genoma, quizás debido a la presencia de secuencias repetitivas de ADN (54) predisponiendo potencialmente de este modo a una alta frecuencia de mutaciones en *katG* Mutaciones puntuales en *katG* son más comunes que las delecciones en aislados clinicos resistentes a INH La mutación puntual que resulta en una substitucion de treonina por serina en el codón 315 (S315T) se presenta en la mayoria de los aislados clinicos resistentes a INH <sup>(74 75)</sup> La mutación S315T está asociada con una reducción del 50% en la actividad catalasa peroxidasa y con un alto nivel de resistencia (MIC=5 10µg/ml) <sup>(76 77)</sup> Se espera que estudios de cristalografía de la catalasa peroxidasa de *M tuberculosis* <sup>(78)</sup> permita una interpretación más exacta de la estructura y los efectos funcionales causados por las mutaciones en aislados clinicos resistentes a INH

### ***Otros genes***

El rol de las mutaciones en *kasA* el cual codifica a  $\beta$  ketoacyl ACP sintasa del sistema sintasa de ácidos grasos tipo II es controversial Reportes iniciales identificaron una asociación entre resistencia clinica de INH y cuatro mutaciones independientes en *kasA* <sup>(79)</sup> pero estudios posteriores reportaron la presencia de 3 de estas mutaciones en cepas sensibles a INH de

*M. tuberculosis* <sup>(80 81)</sup> A pesar de que se ha reportado un incremento de hasta cinco veces en la concentración inhibitoria mínima (CIM) de INH luego de la sobreexpresión de *kasA* en *M. tuberculosis* <sup>(82)</sup> también se ha reportado que la sobreexpresión de *kasA* confirió resistencia a tiolactomicina, un conocido inhibidor de *kasA* pero no incrementó la resistencia a INH en *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y en *M. tuberculosis* <sup>(83)</sup> Utilizando INH radioactiva, Mdluli y colaboradores reportaron que *kasA* está covalentemente asociada con INH y ACP en *M. tuberculosis* <sup>(79)</sup> pero Kremer y colaboradores usaron anticuerpos *anti kasA* para demostrar que el tratamiento con INH en micobacteria no resulta en un secuestro significativo de *KasA* y también demostraron en un ensayo *in vitro* que la INH activada no inhibe la actividad de *kasA* <sup>(84)</sup> Aunque la prevalencia de evidencia sugiere que *inhA* y no *kasA* es el primer blanco de INH en la ruta de síntesis de los ácidos micólicos el rol de las mutaciones de *kasA* en la resistencia a INH de aislados clínicos requiere más investigación

Mutaciones en *ndh* (que codifica NADH deshidrogenasa) demostraron conferir resistencia a INH y etionamida en *M. smegmatis* Tales mutaciones reducen la actividad de NADH deshidrogenasa generando múltiples fenotipos: resistencia cruzada a INH y ETH, letalidad termo sensible y auxotrofia <sup>(85)</sup> Dichas mutaciones se han detectado en el 10% de aislados

clínicos resistentes a INH los cuales no contenían mutaciones en *katG inhA* o *kasA* <sup>(80)</sup>

Se ha observado que mutaciones en la región promotora de *ahpC* conducen a una sobreexpresión de la alquil hidropéroxido reductasa en *M tuberculosis* resistente a INH <sup>(86)</sup> Estas mutaciones raramente se observan en cepas resistentes a INH sin mutación en *katG* <sup>(87)</sup> Sin embargo están presentes en cepas resistentes a INH por mutación en *KatG* presumiendo que esto se deba a un mecanismo compensatorio por la pérdida de actividad de la catalasa peroxidasa en tales cepas <sup>(88 89)</sup> Parece que *ahpC* no juega un rol directo en resistencia a INH, porque la sobreexpresión de *ahpC* en cepa tipo salvaje de referencia de *M tuberculosis* no muestra apreciable incremento de la CIM para INH, por lo que mutaciones en la región promotora de *ahpC* pueden servir como un útil marcador para detección de resistencia a INH

A pesar de la identificación de varias mutaciones genéticas asociadas con resistencia a INH, casi un cuarto de todos los aislados clínicos resistentes a INH no presentan mutaciones en ninguno de los genes antes descritos sugiriendo otros mecanismos alternativos de resistencia a INH

### **3 1 2 Rifamicinas**

Las rifamicinas fueron primero aisladas en 1957 de *Amiclatopsis* (anteriormente *Streptomyces*) *mediterranei* como parte de un programa de detección de antibióticos en Italia <sup>(90)</sup> Su descubrimiento y uso extendido

ha revolucionado la terapia antituberculosa permitiendo la reducción de la duración del tratamiento de 18 meses a 9 meses <sup>(91)</sup> Aunque la actividad bactericida temprana de las rifamicinas es inferior a la de la INH <sup>(92,93)</sup> las rifamicinas son los agentes esterilizadores más potentes disponibles en el tratamiento contra TB mata los bacilos persistentes a lo largo de toda la duración de la terapia <sup>(94 95)</sup>

Las rifamicinas se caracterizan por una única estructura química que consiste de un núcleo aromático unido en ambos lados por un puente alifático <sup>(99)</sup> Aunque los cambios estructurales en posiciones C 21 C 23 C 8 o C 1 pueden reducir significativamente la actividad microbiológica, modificaciones en C 3 no alteran la actividad microbiológica

Las rifamicinas están altamente unidas a proteínas en el plasma, pero difunden fácilmente por la membrana celular de *M. tuberculosis* debido a su naturaleza lipofílica <sup>(100)</sup> La actividad bactericida de las rifamicinas ha sido atribuida a su capacidad para inhibir la síntesis de ARNm por la unión con una alta afinidad a la polimerasa ARN bacteriana dependiente de ADN <sup>(101)</sup>

La Rifampicina es un antibiótico de amplio espectro y es la rifamicina más ampliamente usada para tratar tuberculosis La Rifabutina es otra rifamicina con reducida inducción del sistema enzimático hepático citocromo P-450 originalmente demostró ser efectiva para la profilaxis <sup>(96)</sup>

y tratamiento <sup>(97)</sup> de la infección por el complejo *M avium intracellulare* en personas con una avanzada enfermedad del VIH

Otra rifamicina con propiedades farmacocinéticas favorables es la Rifapentina la cual presenta una mayor concentración en suero y una vida media prolongada, lo cual permite una terapia altamente intermitente para pacientes VIH negativos quienes no tienen cavitación en la placa torácica y quienes tienen cultivo de esputo negativo después de los dos meses de terapia <sup>(98)</sup>

### **3 1 2 1 Mecanismo de acción de Rifampicina**

La estructura central de la ARN polimerasa comprende las subunidades  $\alpha_2\beta\beta'$   $\omega$  evolutivamente conservada entre procariotas lo cual explica la actividad antimicrobiana de las rifamicinas contra un amplio rango de bacterias La cristalografía de rayos X examinando la interacción de Rifampicina y ARN polimerasa de *Thermus aquaticus* reveló que la rifampicina ejerce su efecto al unirse a las dos subunidades  $\beta$  de la ARN polimerasa bloqueando directamente la ruta de elongación del ARN transcrito <sup>(102)</sup>

Aunque el blanco molecular de la rifampicina ha sido bien caracterizado el mecanismo preciso por el cual esta interacción conduce a la muerte de micobacterias aun no está claro



### **3 1 2 2 Gen involucrado en el mecanismo de resistencia a Rifampicina**

#### ***Gen rpoB***

Aunque la resistencia sólo a INH es comun en *M tuberculosis* la resistencia solo a RIF no es comun y más porque el 90% de los aislados resistentes a RIF son también resistentes a INH Por lo tanto resistencia a RIF ha sido usada como un marcador indirecto para detectar tuberculosis multidroga resistente <sup>(103)</sup>

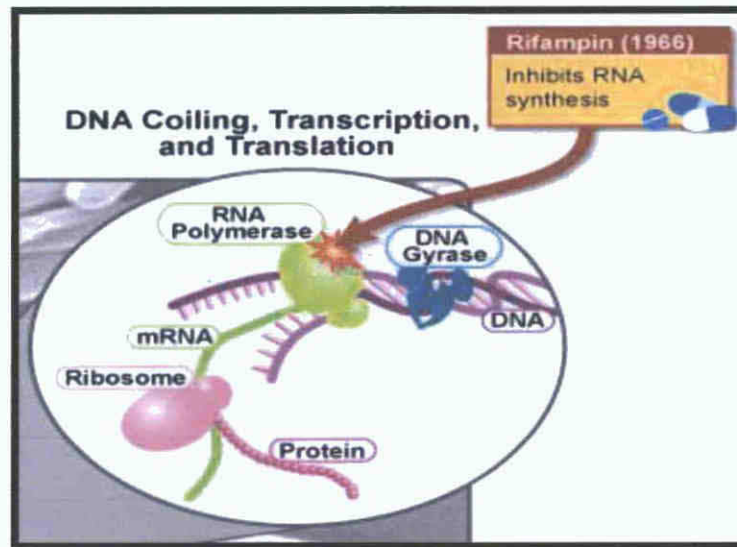
Como en *E coli* <sup>(104 105)</sup> la resistencia a RIF en *M tuberculosis* surge de mutaciones en *rpoB* el cual codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa <sup>(106)</sup> La mayoría de los aislados clinicos resistentes a RIF contienen mutaciones puntuales agrupadas en una región de 81 pares de bases entre los codones 507 y 533 del gen *rpoB* <sup>(107 108)</sup> Aunque al menos de 35 variantes alélicas han sido descritas <sup>(107)</sup> las sustituciones de aminoácidos en una de las dos posiciones (Ser<sub>531</sub> o His<sub>526</sub>) representan la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia clinica a RIF <sup>(106 108 109)</sup> Consistente con los datos clinicos la selección espontánea de resistencia a rifampicina *in vitro* en la cepa de laboratorio de referencia *M tuberculosis* H37Rv muestra mutaciones en *rpoB* solamente en Ser<sub>531</sub> o His<sub>526</sub>, predominando la mutación Ser<sub>531</sub> Leu <sup>(110)</sup> Las cepas con las mutaciones puntuales CAC → TAC (His → Tyr) en el codon 526 y TCG → TTG (Ser → Leu) en el codon 531 responsable del

30% y 25% respectivamente de la resistencia a RIF en aislados clínicos en los Estados Unidos <sup>(111)</sup> En otros países estas mismas mutaciones representan 12% y 47% de los casos resistentes a RIF lo cual sugiere una variación en la frecuencia de aparición de mutaciones en *rpoB* en regiones geográficas diferentes <sup>(107)</sup> A diferencia de las mutaciones en los codones 531 y 526 los cuales confieren un alto nivel de resistencia a RIF (MIC > 32 µg/ml) y resistencia cruzada para todas las rifamicinas <sup>(100)</sup> mutaciones en los codones 511 516 y 522 están asociados con bajo o alto nivel de resistencia a rifampicina y rifapentina (MIC 2 32 µg/ml) pero con sensibilidad a rifabutina y a la nueva rifamicina, rifalazil <sup>(112,113)</sup> Mutaciones raras en *M. tuberculosis* han sido también reportadas en la región 5 del gen *rpoB* y una de estas mutaciones en V176F confiere una resistencia de intermedia a alta a RIF <sup>(114 115)</sup>

Varias cepas de micobacterias de rápido crecimiento *M. smegmatis* *M. chelonae* *M. flavescens* y *M. vaccae* son capaces de inactivar RIF por ribosilación conduciendo a una resistencia inherente a este antibiótico <sup>(116 117)</sup> Sin embargo este mecanismo de resistencia a RIF no ha sido descrito en *M. tuberculosis* No obstante un pequeño porcentaje de aislados resistentes a RIF (<5%) no presentan ninguna mutación en el gen *rpoB* sugiriendo un mecanismo molecular de resistencia a RIF en *M. tuberculosis*

como por ejemplo una permeabilidad alterada a RIF o mutaciones en otras subunidades de la ARN polimerasa.

**Figura 8**  
**Mecanismo de acción de la Rifampicina**



## **METODOLOGÍA**

### **1 Tipo de estudio Descriptivo – retrospectivo**

**2 Universo** El universo estaba conformado por todas las muestras de esputo con cultivo positivo para *Micobacterium tuberculosis* que se recibieron en el Departamento de Micobacteriología del Laboratorio Central de Referencia de Salud Pública – Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud, durante los años 2001 al 2011

**3 Muestras** Las muestras seleccionadas fueron todas las muestras con cultivo positivo para *Micobacterium tuberculosis* que luego de realizar el método de las proporciones múltiples de Canetti resultaron resistentes a INH y RIF. Fueron en total 66 aislados TB MDR panameños recolectados desde el 2001 hasta el año 2010. Y 31 muestras sensibles como control negativo recolectados entre 2009 y 2010

### **4 Criterio de inclusión**

**Grupo experimental** Aislados TB MDR recolectados entre 2001 y 2010

**Grupo control** Aislados de TB sensibles recolectados entre 2009 y 2010

### **5 Criterios de exclusión**

**Grupo experimental** Aislados de TB sensibles

**Grupo control** Aislado de TB MDR

## **6 Métodos**

Se realizaron los siguientes procedimientos

- 1 Identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a nivel molecular con el kit comercial AccuProbe Gen Probe
- 2 Extracción del ADN genómico
- 3 Amplificación de los genes *katG inhA inhA mabA* y *rpoB* involucrados en la resistencia a Isoniacida y Rifampicina, respectivamente
- 4 Secuenciación de los genes involucrados en la resistencia a Rifampicina e Isoniacida de las cepas en estudio e identificación de las mutaciones
- 5 PCR Multiple alelo específico

### **6.1 IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LAS CEPAS EN ESTUDIO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL ACCUPROBE – GEN PROBE**

El primer objetivo específico de este proyecto fue realizar nuevamente la identificación pero a nivel molecular empleando el Kit comercial AccuProbe de Gen Probe para identificación a partir de cultivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

**Principio** Los ensayos que utilizan hibridación de ácidos nucleicos se basan en la capacidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos para

unirse de modo específico formando complejos bicatenarios estables. El método ACCUPROBE utiliza una sonda de DNA monocatenario conjugado con un marcador quimioluminiscente complementario del RNA ribosómico (RNAr) del organismo diana. Cuando el RNAr del organismo diana es liberado, la sonda se hibrida con este para formar un complejo DNA-RNA estable. El reactivo de selección permite diferenciar las sondas hibridadas de las no hibridadas. El luminómetro GEN PROBE permite medir la señal luminosa emitida por los híbridos DNA-RNA. El resultado es positivo si el luminómetro indica un valor superior o igual al valor umbral; es negativo si indica un valor inferior.

### **Procedimiento**

#### **A Identificación a partir de cultivo en medio sólido**

- 1 La muestra se obtuvo con un asa metálica a partir del medio de cultivo
- 2 En la medida de lo posible se evitó que la muestra incluyera medio de cultivo junto con las micobacterias

#### **B Preparación del material**

- 1 Se llenó el sonicador con agua suficiente hasta aproximadamente 1 cm del borde

- 2 El agua del baño de ultrasonidos fue cuidadosamente desgasificada antes de la manipulación con el fin de optimizar la transferencia de energía de los ultrasonidos. Para desgasificar a fondo el agua, se puso a funcionar el sonicador durante 15 minutos antes de ser utilizado en cada lote de pruebas.
- 3 Se empleó un bloque a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y un baño maría a  $59 - 61^{\circ}\text{C}$ .
- 4 Se utilizó el luminómetro 501 de GEN PROBE. Verificando que la cantidad de Reactivos de Detección I y II era suficiente para realizar las pruebas.

### **C Controles**

Como control positivo se utilizó la cepa American Type Culture Collection (ATCC 25177) de *M. tuberculosis* y un cultivo de *M. avium* del College American Pathology (CAP) como control negativo.

### **D Preparación de la muestra**

- 1 Se identificaron los tubos de lisis con los correspondientes números de ID de cada cepa. Se trabajaron en grupos de 11 a 13 incluyendo en cada grupo el control negativo y positivo.
- 2 Se transfirió con micropipeta 100µl de Reactivo 1 (Reactivo de Lisis) y 100µl de Reactivo 2 (Tampon de Hibridación) en todos los tubos de lisis.

- 3 Se transfirió la muestra proveniente del medio sólido al tubo de lisis agitando el asa en la solución para poner las células en suspensión
- 4 Una vez tapados los tubos de lisis se agitaron brevemente con ayuda de un vortex

#### **E Lisis de la muestra**

- 1 Los tubos de lisis se introdujeron en el portatubos del sonicador de manera que la muestra, en el fondo de los tubos quedó sumergida manteniendo los tapones fuera del agua
- 2 Se procedió con la sonicación durante 15 minutos
- 3 Luego se colocaron los tubos de lisis en el bloque calefactor a  $95^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos

#### **F Hibridación**

- 1 Una vez retirados los tubos de lisis del bloque calefactor se rotularon igual cantidad de tubos de Reactivo Sonda con los correspondientes números de identificación
- 2 Después se tomó 100µl de muestra de los tubos de lisis y se transfirió a su correspondiente tubo de Reactivo Sonda



**4 Tapados los tubos de Reactivo Sonda fueron incubados durante 15 minutos a 59 5° 61°C en baño maria**

## **G Selección**

**1 Retirados los tubos de Reactivo Sonda del baño maria se añadió 300µl de Reactivo 3 (Reactivo de Selección) en cada tubo Tapados los tubos fueron agitados con un Vortex para obtener una mezcla homogenea**

**2 Se incubaron los tubos de Reactivo Sonda durante 10 minutos a 59 5° 61°C al baño maria**

**3 Retirados los tubos de Reactivo Sonda del baño maria se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos Se leyeron los resultados dentro de los 15 minutos siguientes**

## **H Detección**

**1 Se seleccionó el protocolo # 4 para ACCUPROBE en el Luminómetro**

**2 Se limpió la superficie de los tubos con papel absorbente**

**3 Los tubos se colocaron los tubos en el Luminómetro y se procedió a obtener la lectura de cada muestra**

## **I Interpretación de los resultados**

Los resultados del test accuprobe para identificación a partir de cultivo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* son interpretados en función de un valor umbral. Las muestras que producen una señal luminosa de valor superior o igual a este umbral son consideradas positivas. Las señales luminosas inferiores a este umbral son consideradas negativas. Cuando el resultado se sitúa en una zona de incertidumbre, la prueba debe repetirse. Si un segundo análisis sigue dando resultados dudosos, debe sembrarse nuevamente la cepa con el fin de verificar su pureza.

### **ACCUPROBE/Luminómetro 501**

**Tabla 2**

<b>RLU</b>	<b>Interpretación</b>
<b>&lt;20000</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>20000 – 29999</b>	<b>ZONA DE INCERTIDUMBRE</b>
<b>≥ 30000</b>	<b>POSITIVO</b>

## **6 2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL DE QIAGEN**

- 1 Se transfirieron 20µl de Proteinasa K en el fondo del tubo de microcentrifuga de 1.5ml**
- 2 Se añadieron 200µl de muestra al tubo del paso anterior**
- 3 Se añadieron 200µl de buffer AL a la muestra, vortex por 15s**
- 4 Se incubó a 56°C por 10 minutos**
- 5 Se procedió a centrifugar brevemente para remover las gotas que estaban en la tapa**
- 6 Se añadieron 200µl de etanol (96-100%) a la muestra y vortex por 15s**  
**Después del vortex centrifugar brevemente el tubo de microcentrifuga para remover las gotas de la tapa**
- 7 Se procedió a agregar cuidadosamente la mezcla del paso 6 a la columna QIAamp Mini spin que viene con su tubo de colección de 2ml. Luego se procedió a centrifugar a 8000rpm por 1 min. Luego se descartó el tubo de colección que contiene el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de colección de 2ml**
- 8 Cuidadosamente se destapó la columna y se añadió 500µl del buffer AW1 a la columna. Se centrifugó por 8000rpm por 1 minuto y se procedió a descartar el filtrado**

- 9 Se añadió a la columna 500µl de buffer AW2 Sé centrifugo a máxima velocidad (14000rpm) por 3 minutos y se descartó el tubo de colección con el filtrado
- 10 Se colocó la columna QIAamp Mini spin en un nuevo tubo de colección y se centrifugó por 2 minutos a máxima velocidad (14000rpm)
- 11 Se colocó la columna QIAamp Mini spin en un tubo de 1.5 de microcentrifuga limpio y se añadió a la misma 200µl de buffer AE o agua destilada Se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) por 2 minutos y luego se centrifugó (8000rpm) por 2 minutos
- 12 Se conservó el ADN extraído a 20 °C

### **6.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *KatG*, *INH*, *INH*-*MAB* Y *RPO* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA, RESPECTIVAMENTE**

Se amplificaron regiones específicas de los genes *KatG*, *inhA*, *inhA*, *mabA* y *rpoB* involucrados en la resistencia a INH y RIF respectivamente en las 66 cepas TB MDR y de las 31 cepas de *M. tuberculosis* sensibles a los antifímicos (control negativo). Los cebadores y las condiciones para la amplificación y secuenciación de los genes involucrados en la resistencia de *M. tuberculosis* fueron adoptados de estudios previos <sup>(118-119)</sup> (Cuadro 4).

Cuadro 4

Gen	Primer (5'-3')	Longitud del producto de PCR (pb)	Ciclo de amplificación
KatG			
KatGOF	GCAGATGGGGCTGATCTACG	435	96°C 3 min, 25 X (95°C 50s, 68°C 40s, 72°C 1min), 72°C 10min
KatG4R	AACGGGCTCCGGGATGGTG		
InhA			
inhAF	GTATGGGCCACTGACACACACAC	885	94°C 1 min, 26 X (94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 1 min 30s), 72°C 7min
InhAR	CCGCCGAACGACAGCAGCAGGA		
mabA-inhA:-15			
inhAPF	AATTGGCGGCTCAGTTCCACAC	648	94°C 1min, 26 X (94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 1min 10s), 72°C 7min
inhAPR	CTGCGCGATGCCCGTTGAGC		
RpoB			
ROF	GTGCGCGCGATCAAGGA	250	96°C 3min, 25 X (95°C 50s, 65°C 40s, 72°C 20s), 72°C 3min
RIR	TGACCCCGCGGTACAC		

**La mezcla de reacción se describe a continuación**

**Tabla 3**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Concentración</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1 0</b>	<b>50mM</b>
<b>DNTPs</b>	<b>1 5</b>	<b>10mM</b>
<b>Taq Pol</b>	<b>0 5</b>	<b>5U/ul</b>
<b>Buffer</b>	<b>2 5</b>	<b>10X</b>
<b>Primer F</b>	<b>0 5</b>	<b>10µM</b>
<b>Primer R</b>	<b>0 5</b>	<b>10µM</b>
<b>ADN</b>	<b>3 0</b>	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>15 5</b>	

### **6 3 1 Electroforesis en gel de agarosa**

**Los productos de las amplificaciones fueron corridos en gel de agarosa al 0 5% en TBE 0 5X La electroforesis se realizó a 100V por una hora y los productos de la amplificación fueron visualizados en un transiluminador UV a 300nm**

**Los resultados de la corrida fueron registrados mediante una foto con el fotodocumentador para evaluar los productos obtenidos en relación a la escalera de peso molecular y al tamaño esperado**

### **6 3 2 Purificación de productos de PCR**

**Las muestras que amplificaron fueron purificadas por el método AgarAce<sup>TM</sup> de Promega El procedimiento se realizó igual como lo especifica el fabricante en el boletín técnico AgarAce<sup>R</sup> Agarose Digesting Enzyme No 228**

### **Cuantificación de productos purificados**

**Una vez purificados los productos fueron cuantificados**

**La cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro (biofotómetro) y diluyendo las muestra 1/50 para su medición**

## **6.4 SECUENCIACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA DE LAS CEPAS EN ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES**

En la reacción de secuenciación de cada gen se utilizaron los mismos cebadores de la amplificación. La secuenciación se realizó usando el reactivo de BigDye Terminator v 3.1 de Applied Biosystem. Los volúmenes de la muestra variaron en la mezcla de reacción de acuerdo a la concentración en cada muestra. El volumen final de la reacción fue de 20 µl (Tabla 4).

**TABLA 4**

	<b>Buffer 5X</b>	<b>Big Dye</b>	<b>Primer</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Muestra</b>	<b>Volumen Total</b>
KatGOF	3	2	1	12	2.0	20
KatG4R	3	2	1	12	2.0	20
inhAF	3	2	1	12.5	1.5	20
inhAR	3	2	1	12.5	1.5	20
inhAPF	3	2	1	12.5	1.5	20
inhAPR	3	2	1	12.5	1.5	20
ROF	3	2	1	12	2.0	20
RIR	3	2	1	12	2.0	20
PGEM	3	2	1	13	1	20

### **1 Edición de Secuencias**

Las muestras amplificadas y secuenciadas se editaron utilizando el software de análisis Sequencher para eliminar las áreas que no se podían leer claramente y para evaluar la base nucleotídica presente en la secuencia. Se



examinaron las secuencias para ver la presencia de cambios nucleotídicos en comparación a la cepa de referencia H37RV.

## 2. Análisis de los productos de secuenciación

Los datos de secuenciación fueron analizados y comparados con la cepa de referencia H37Rv (GenBank accession number NC\_000962.2) usando ClusterW multialignment.

### **6.5 PCR MÚLTIPLE ALELO ESPECÍFICO**

Se realizó PCRMAS a todas las muestras en estudio, a partir del ADN extraído utilizando los siguientes cebadores adoptados de estudios previos (118,119) (Cuadro 5).

**Cuadro 5**

Mutaciones blancos	Primers alelo específico (5'-3')	Longitud del producto de PCR
KatG 315	KatG5R ATACGACCTCGATGCCGC KatGOF GCAGATGGGGCTGATCTACG	292
mabA-inhA:-15	InhAP-15 GCGCGGTCA GTTCCACA InhAPF2 CACCCCGACAACCTATCG	270
rpoB516	rpoB516 CAGCTGAGCCAATTCATGGA RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	218
rpoB526	rpoB526 CTGTCGGGGTTGACCCA RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	185
rpoB531	rpoB531 CACAAAGCGCCGACTGTC RIRm TTGACCCGCGCGTACAC	170

La mezcla de reacción para PCRMAS: El volumen final de la mezcla de reacción fue de 24.6µl con las siguientes concentraciones que se muestran a continuación:

**Tabla 5**

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
rpoB516	10µM	0,1
rpoB526	10µM	0,5
rpoB531	10µM	3,25
RIRm	10µM	3,0
KatgOF	10µM	0,1
Katg5R	10µM	0,1
inhAP-15	10µM	0,6
InhAPF	10µM	0,6
Taq	5U/µl	0,1
DNTPs	10Mm	0,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	2,0
PCR Buffer	10X	2,5
DNA	-	1,0
H <sub>2</sub> O	-	10,25

## 1. Ciclo de amplificación

El ciclo de amplificación de PCRMAS fue: 96°C 3min, 23 ciclos de 95°C 50s, 68°C 40s, 72°C 1min y una extensión final a 72°C 7min.

## 2. Detección

Los productos de PCR-MAS fueron detectados en electroforesis en gel de agarosa al 2.5% con Buffer Tris –Borato-EDTA al 1X, durante una hora cuarenta y cinco minutos. Cada pocillo del gel fue cargado con 20µl (15µl de muestra más 5µl de loading buffer).

Interpretación de los resultados en el gel de agarosa: El extremo 3' terminal de cada cebador alelo específico anidará por complementariedad con la

segunda base del respectivo codón en estudio. Por lo que si en el ADN blanco no hay mutaciones en estas bases o sitios blancos el cebador anidará y la polimerasa extenderá la cadena dándose un producto de amplificación. Sin embargo, cuando el ADN en estudio presente una mutación puntual de las descritas anteriormente el cebador alelo específico no podrá ser extendido por la ADN polimerasa por lo que no habrá producto de amplificación para esa región.

#### **6.6 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCRMAS CON LOS OBTENIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REFERENCIA.**

Con los resultados obtenidos de esta comparación se calculará la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica PCRMAS.

## RESULTADOS

### ► IDENTIFICACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LOS AISLADOS EN ESTUDIO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL ACCUPROBE – GEN PROBE

El kit comercial AccuProbe Gen Probe confirmó la identificación bioquímica previa (prueba de niacina, reducción de nitrato e inhibición de la catalasa) realizada a cada uno de los 98 aislados en estudio. Valores de RLU superiores a 30000 corroboraron la presencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en cada una de las muestras analizadas.

#### Identificación molecular del complejo *M. tuberculosis* del grupo de aislados para control negativo

##### Aislados sensibles

PPOTOCOL AP MYCOBAC			
THURSDAY JULY 29 20 0 5 8 PM			
SOFTWARE REVISION GP1 3 06			
SYSTEM SERIAL NUMBER 203360			
YP COUNT TIME DNA 100AL			
VIT LOT NUMBER 2 SEC			
OPERATOR MYCOBACTERIOLOGI -LCREP			
REPORT NG THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW	20000	ND	NEGATIVE
BETWEEN	20000	29999	
ABOVE/EQUAL	30000		POSITIVE
SAMPLE REPL RLU FLAG			
2		2068	POS
3		659	NEG
	1	525370	POS
5	1	555922	POS
6	1	54 526	POS
	1	523159	POS
	1	395.6	POS
8		830 6	POS
9		95541	POS
10	1	517595	POS
1		95 55	POS
2		6 657	POS
13	1	185238	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctl POS	POSITIVO
2	Ctl NEG	NEGATIVO
3	7	POSITIVO
4	75	POSITIVO
5	85	POSITIVO
6	91	POSITIVO
7	92	POSITIVO
8	137	POSITIVO
9	157	POSITIVO
10	191	POSITIVO
11	211	POSITIVO
12	233	POSITIVO
13	235	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

### Aislados sensibles

PROTOCOL		AP MNC02AC	
THURSDAY JULY 29 2010		6 8 PM	
SOFTWARE REVISION		GPI 3 06	
SYSTEM SERIAL NUMBER		203368	
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
KI LOT NUMBER			
OPERATOR		MCDWATER10LOMI LCRSP	
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW	20000		NEGATIVE
BETWEEN	20000	NO	29999
ABOVE/EQUAL		30000	POSITIVE
--			
SAMPLE	REPL	RL	FLAG
		1 216	POS
2		1303	NEG
3	1	85057	POS
	1	500203	POS
5		302	POS
6		54 073	POS
		563 02	POS
8		3651	POS
9	1	515482	POS
0		80384	POS
	1	516048	POS
2		304798	POS
		27828	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	267	POSITIVO
4	268	POSITIVO
5	270	POSITIVO
6	327	POSITIVO
7	330	POSITIVO
8	333	POSITIVO
9	356	POSITIVO
10	363	POSITIVO
11	368	POSITIVO
12	377	POSITIVO
13	382	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados sensibles

PROTOCOL                      AP MYCOBAC THURSDAY JULY 29 2010      8 07 PM SOFTWARE REVISION              GPI 3 06 SYSTEM SERIAL NUMBER              203368  TYPE                                      DNA EQUAL COUNT TIME                              2 SEC KIT LOT      UMBER OPERATOR      MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP			
REPORT NG      RRESHOLDS  SAMPLE BELOW                      20000                      NEGATIVE BETWEEN                      20000 AND                      29999 ABOVE/EQUAL                      30000                      POSITIVE			
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	485911	POS
2	1	1594	NEG
3	1	515556	POS
	1	276390	POS
5	1	547021	POS
6	1	218185	POS
7	1	2      6	
8	1	73174	POS
9	1	0      938	POS
10	1	305861	POS
11	1	01311	POS
12	1	72636	POS
13	1	83947	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	386	POSITIVO
4	397	POSITIVO
5	398	POSITIVO
6	400	POSITIVO
7	402	Zona de incertidumbre
8	404	POSITIVO
9	406	POSITIVO
10	408	POSITIVO
11	414	POSITIVO
12	415	POSITIVO
13	425	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados sensibles

REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE	00 0	RELATIVE	
BELOW	20000	D	30000 POSITIVE
BETWEEN			
ADDOVL/EQUAL			
SAMPLE	REPL	RLU	FLAC
1		701.2	POS
2	1	119	NEG
3	1	5.253	POS
4	1	06910	POS
5	1	3882	POS
6	1	0039	POS
7	1	7.636	POS
8	1	129329	POS
	1	6.67	POS
10	1	7083	POS
1	1	7681	POS
2		0	POS

# Sample	Cepas sensibles	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	427	POSITIVO
4	432	POSITIVO
5	437	POSITIVO
6	441	POSITIVO
7	462	POSITIVO
8	465	POSITIVO
9	471	POSITIVO
10	472	POSITIVO
11	474	POSITIVO
12	498	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Identificación molecular del complejo *M. tuberculosis* del grupo de

### aislados MDR

#### Aislados MDR

*** ** ** *****XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX			
PROTOCOL 4 AP MYCOBAC			
TUESDAY JULY 20 2010 5 15 PM			
SOFTWARE REVISION GPI 3 06			
SYSTEM SERIAL NUMBER 203368			
TYPE DNA IQUAL			
COUNT TIME 2 SEC			
KIT LOT NUMBEP			
OPERATOR MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP			
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW 20000 NEGATIVE			
BETWEEN 20000 AND 29999 +/-			
ABOVE/EQUAL 30000 POSITIVE			
-			
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	203786	POS
2	1	394807	POS
3	1	379855	POS
4	1	550026	POS
5	1	410688	POS
6	1	511384	POS
7	1	322270	POS
8	1	403445	POS
9	1	477042	POS
10	1	474986	POS
11	1	384806	POS
12	1	337003	POS
13	1	719	NEG
14	1	410210	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	0201	POSITIVO
2	0202	POSITIVO
3	0203	POSITIVO
4	0204	POSITIVO
5	0205	POSITIVO
6	0206	POSITIVO
7	0207	POSITIVO
8	0208	POSITIVO
9	0209	POSITIVO
10	0301	POSITIVO
11	0303	POSITIVO
12	0305	POSITIVO
13	Ctrl NEG	NEGATIVO
14	Ctrl POS	POSITIVO

#### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177



## Aislados MDR

***** <X *****>*****			
PPOTOCOL	4	AP MYCOBAC	
MONDAY	JULY 26	2010	3 36 PM
SOFTWARE REVISION		GPI	3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER			203368
TYPE		DNA EQUAL	
COUNT TIME		2 SEC	
KIT LOT NUMBER			
OPERATOR		MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP	
-	-	--	--
REPORTING THRESHOLDS			
SAMPLE			
BELOW	20000		NEGATIVE
BETWEEN	20000 AND	29999	+/
ABOVE/EQUAL		30000	POSITIVE
--	-	-	-
SAMPLE	REPL	RLU	FLAG
1	1	282847	POS
2	1	1679	NEG
3	1	516458	POS
4	1	519110	POS
5	1	486450	POS
6	1	522515	POS
7	1	134059	POS
8	1	473977	POS
9	1	320276	POS
10	1	492203	POS
11	1	403662	POS
12	1	459644	POS
13	1	241890	POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0308	POSITIVO
4	0307	POSITIVO
5	0308	POSITIVO
6	0309	POSITIVO
7	0311	POSITIVO
8	0313	POSITIVO
9	0314	POSITIVO
10	0315	POSITIVO
11	0316	POSITIVO
12	0317	POSITIVO
13	0403	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

```

X      XX      XX
PROTCGL      AP MYCOBAC
WEDNESDAY JULY 21 2010      8 10 AM
SOFTWARE REVISION      GP1 3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER      203368
TYPE      DNA EQUAL
COUNT TIME      2 SEC
KIT LOT NUMBER
OPERATOR      MYCOBACTERIOLOGIA LCESP
REPORTING THRESHOLDS
SAMP_E      20000      NEGATIVE
BELOW      20000 AND      29999
BETWEEN      30000 POSITIVE
ABOVE EQUAL
SAMPLE      REPL      RLU      FLAG      POS
1      1      371231      POS
2      1      5051      NEG
3      1      2151      POS
5      1      80880      POS
6      1      83052      POS
7      1      65168      POS
8      1      474596      POS
9      1      497195      POS
10     1      462210      POS
10     1      3992 1      POS

```

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0401	POSITIVO
4	0402	POSITIVO
5	0404	POSITIVO
6	0410	POSITIVO
7	0505	POSITIVO
8	0601	POSITIVO
9	0602	POSITIVO
10	0604	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

## Aislados MDR

```

-- -- -- -- --
PROTOCOL 4 AP MYCOBAC
WEDNESDAY JULY 28 2010 6 18 PM
SOFTWARE REVISION GPI 3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER 203368

TYPE DNA IQUAL
COUNT TIME 2 SEC
KIT LOT NUMBER
OPERATOR MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP

-- -- -- -- --
REPORTING THRESHOLDS

SAMPLE
BELOW 20000 NEGATIVE
BETWEEN 20000 AND 29999 /
ABOVE/EQUAL 30000 POSITIVE

-- -- -- -- --
SAMPLE REPL RLU FLAG
1 1 96747 POS
2 1 16528 NEG

```

```

XXXX * X XXXX XXXXXX XXXXXXXXXX
PROTOCOL 4 AP MYCOBAC
WEDNESDAY JULY 28 2010 6 23 PM
SOFTWARE REVISION GPI 3 06
SYSTEM SERIAL NUMBER 203368

TYPE DNA IQUAL
COUNT TIME 2 SEC
KIT LOT NUMBER
OPERATOR MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP

-- -- -- -- --
REPORTING THRESHOLDS

SAMPLE
BELOW 20000 NEGATIVE
BETWEEN 20000 AND 29999 /
ABOVE/EQUAL 30000 POSITIVE

-- -- -- -- --
SAMPLE REPL RLU FLAG
1 1 438467 POS
2 1 520315 POS
3 1 488971 POS
4 1 445711 POS
5 1 440227 POS
6 1 416244 POS
7 1 553949 POS
8 1 446047 POS
9 1 458628 POS
10 1 449903 POS
11 1 537002 POS

```

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
1	0405	POSITIVO
2	0407	POSITIVO
3	0409	POSITIVO
4	0411	POSITIVO
5	0412	POSITIVO
6	0501	POSITIVO
7	0503	POSITIVO
8	0506	POSITIVO
9	0803	POSITIVO
10	0805	POSITIVO
11	0808	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

### Aislados MDR

```

X      N      RU      XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
PROTOCOL    4      AP MYCOBAC

WEDNESDAY JULY 28 2010      6 47 PM
SOFTWARE REVISION      GP1    3 05
SYSTEM SERIAL NUMBER      20336

TYPE      DNA IQUAL
COUNT TIME      2 SEC
KIT LOT NUMBER
OPERATOR      MYCOBACTERIOLOGIA LCRSP

--      --      --
--      --      --
REPORTING THRESHOLDS

SAMPLE
BELOW      20000      NEGATIVE
BETWEEN      20000 AND      29999
ABOVE/EQUAL      30000-POSITIVE

--      --      --
SAMPLE      REPL      RLU      FLAG
1      1      559218      POS
2      1      2122      NEG
3      1      488964      POS
4      1      158116      POS
5      1      50 967      POS
6      1      531570      POS
7      1      511090      POS
8      1      497731      POS
9      1      499744      POS
10     1      70388      POS
11     1      515701      POS
12     1      73809      POS
13     1      52 252      POS

```

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	0607	POSITIVO
4	0608	POSITIVO
5	0609	POSITIVO
6	0702	POSITIVO
7	0703	POSITIVO
8	0707	POSITIVO
9	0708	POSITIVO
10	0801	POSITIVO
11	0802	POSITIVO
12	0803	POSITIVO
13	0804	POSITIVO

**Nota**

**Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)**

**Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177**

## Aislados MDR

PPOTOCOL	4	AP MYCOBAC
WEDNESDAY JULY 28 2010	7 06 PM	
SOFTWARE REVISION	GP1 3 06	
SYSTEM SERIAL NUMBER	203358	
TYPE	DNA EQUAL	
COUNT TIME	2 SEC	
KIT LOT NUMBER		
OPERATOR	MYCOBACTERIOLOGIA LCRES	
REPORTING THRESHOLDS		
SAMPLE		
BELOW	20000	NEGATIVE
BETWEEN	20000 AND	29999
ABOVE/EQUAL	30000	POSITIVE
SAMPLE	REPL	RLU
1	1	458569
2	1	1519
3	1	1171
4	1	468773
5	1	514355
6	1	501458
7	1	96195
8	1	543431
9	1	479650
10	1	533848
11	1	4 7 64
12	1	490831
		FLAG
		POS
		NEG
		NEG
		POS
		POS
		POS
		POS
		POS
		POS
		POS
		POS

# Sample	Cepas MDR	Identificación del complejo M tuberculosis
1	Ctrl POS	POSITIVO
2	Ctrl NEG	NEGATIVO
3	Ctrl NEG asa	NEGATIVO
4	Mono	POSITIVO
5	0902	POSITIVO
6	0903	POSITIVO
7	0904	POSITIVO
8	0905	POSITIVO
9	0906	POSITIVO
10	0907	POSITIVO
11	0908	POSITIVO
12	0909	POSITIVO

### Nota

Ctrl NEG Control Negativo = *Micobacterium avium* (CAP)

Ctrl POS Control Positivo = *Micobacterium tuberculosis* ATCC25177

➤ **EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL DE QIAGEN**

Se empleó el Kit comercial de columna de QIAamp DNA Mini Kit para la extracción del material genético de cada uno de los aislados

La extracción se realizó por grupos de 11 aislados más el control de extracción negativo

Cuatro (4) grupos para los aislados sensibles (control negativo) Y seis (6) grupos para los aislados MDR

**AISLADOS SENSIBLES (CONTROL NEGATIVO)**

Grupo Nº1 7 75 85 91 92 137 157 191,211 233 235

Grupo Nº2 267 268 270 327 330 333 356 303 368 377 382

Grupo Nº3 386 397 398 400 402 404 406 408 414 415 425

Grupo Nº4 427 432 437 441 462 465 471 472 474 498

**AISLADOS MDR**

Grupo N 1

0201 0202 0203 0205 0206 0207 0208 0209 0301 0303 0305

Grupo Nº2

0306 0307 0308 0309 0311 0313 0314 0315 0316 0317 0401

Grupo Nº3

0402 0403 0404 0405 0407 0409 0410 0411 0412 0501 0503

**Grupo N°4**

**0505 0506 0601 0602 0603 0604 0605 0606 0607 0608 0609**

**Grupo N°5**

**0702 0703 0708 0707 0801 0802 0803 0804 0902 0903 0904**

**Grupo N°6**

**0905 0906 0907 0909 0705 0908**

**Luego de la extracción se determinó la concentración de ADN (260/280nm) presente en cada una de las muestras usando el equipo BioPhotometer Eppendorf (Tabla 6)**

**TABLA 6**  
**CONCENTRACIONES DE ADN**

ID	µg/µl	ID	µg/µl	ID	µg/µl
0201	5 1	0603	12 9	7	14 9
0202	7 2	0604	40 1	91	12 4
0203	3 8	0605	120 6	92	11 7
0205	2 4	0606	40 5	137	22 7
0206	21 3	0607	34 4	157	11 2
0207	13 7	0609	45 1	191	11 2
0208	4 3	0610	6 7	211	14 1
0209	68 8	0611	3 9	235	27 3
0301	3 3	0702	23 3	267	31 9
0303	4 8	0703	5 8	268	11 0
0304	7 1	0704	8 2	270	34 1
0305	30 3	0705	4 1	327	45 4
0306	3 3	0706	6 6	330	13 4
0307	9 2	0707	37 7	333	30 1
0308	90 2	0708	7 3	363	17 5
0309	52 5	0801	6 4	377	12 8
0311	14 8	0802	37 2	382	17 3
0313	28 7	0803	36 5	386	70 7
0314	8 8	0804	41 9	397	13 8
0315	6 2	0805	4 5	400	39 2
0316	22 2	0902	8 8	402	68 5
0317	4 2	0903	12 9	404	85 4
0401	5 1	0904	11 8	406	104 5
0402	17 8	0906	29 1	425	11 1
0403	20 8	0907	23 5	427	19 5
0404	17 4	0908	13 3	432	73 4
0405	36 4	0909	17 1	437	22 6
0407	13 6	1005	11 0	441	21 8
0408	4 6	1006	12 9	462	37 7
0410	42 3	1007	11 4	465	28 2
0411	46 5	1101	15 2	498	75 1
0412	18 1				
0501	24 5				
0503	15 6				
0505	16 2				
0601	39 3				
0602	20 3				

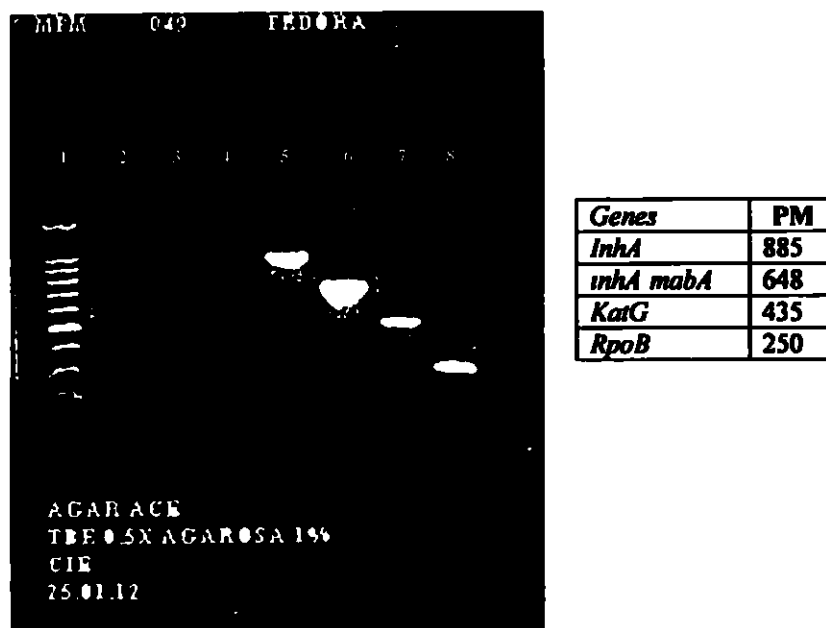


➤ **AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *katG*, *inhA*, *inhA-mabA* Y *rpoB* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA, RESPECTIVAMENTE**

Los productos de amplificación de cada uno de los genes en estudio de los 98 aislados fueron evaluados en base a su peso molecular en gel de agarosa al 1% y TBE 0.5X

A continuación los mismos pueden diferenciarse utilizando el marcador de peso molecular como se observa en la Figura 8

**Figura 8**



**Figura 8** Productos de amplificación de los genes *inhA*, *inhA mabA*, *katG* y *rpoB*  
 Carril 1 marcador de peso (100bp DNA Ladder / Promega)  
 Carril 5 gen *inhA* 885pb  
 Carril 6 gen *inhA mabA* 648pb  
 Carril 7 *katG* 435 pb  
 Carril 8 *rpoB* 250pb

➤ **SECUENCIACIÓN DE LAS REGIONES ESPECÍFICAS DE LOS GENES *rpoB*, *katG*, *inhA*, *inhA-mabA* INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA DE LOS AISLADOS EN ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES**

A continuación se presentan las secuencias de las regiones específicas de cada uno de los genes en estudio *katG* *rpoB* *inhA* *inhA* *mabA* de la cepa de Referencia H37Rv y de los aislados MDR 0202 0208 0402 0409 0605 0708 0801 1005 representativos de cada una de las mutaciones identificadas

**Muestra Cepa de Referencia H37Rv**

**Gen *katG***

**Wild Type**

>H37Rv\_KatG

```
GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTCGCGACC
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGCCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA
CGGCCGCGGCGGCCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTCCGCGCGCTTAACAGCTGGCCGACAACGCCAGC
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC
TGATTGTTTTTCGCGCGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGGTTCCGGCTTCGGCCG
GGTCGACCACTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGCGCATGAGCGTTAC
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGCGCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCACATTGCGGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT
GAACGACGTCGAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTCACTTTTGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG
GCCGATCTGGTGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCAGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCGACGAA
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCGGTGCCGGCACCATCCGGACCCGTTCCGGCGGCGCAGGGCGCT
CCCCGACGATGCTGGCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCAAGGCCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG
GGTCCCGTTGCGAGATACTTGGGCCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG
CGGTCAGCCACGACCTGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT
GACTGTCTCACAGTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGCGCTGCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC
GGCGCCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCCGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC
TGCGCAAGGTCATTGCAACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA
AGTGTCCTTCGCGGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGGCGGTGGC
CACAACATCACGGTGCCCTTACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT
TTGCCGTGCTGGAGCCAAAGGCAGATGGCTTCCGAACTACCTCGGAAAGGGCAACCGTTGCCGGCCGA
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGAAGTGGC
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCCCTCCGAGTCACTGA
CCAACGACTTCTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCAGGCGCGGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGACGAGT
TCGTGCTGCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGTGTA
```

Aislado 0202  
Gen *kaiG*  
Mutación wild type

>fedora0202c\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCCGGGAGGTCGCGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGGCGCCGGGGCGGCATGCAGCGGTTGCGCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTGCGCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTGCGGTTGCGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGATCTGGAGAACCCTGCTGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCAGATTGCGGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAAGACGCGATCACCAGCAGCATCGAGGTCTGATGGACGAACACCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCTGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCCGACCCGTTGCGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCATTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTGCGCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCCGCTGGTCCCAAGCAGACCCGCTGTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTGCAACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGCGGCTGGC  
CACAACATCACGGTGCCCTTACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCCGAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAACTACAAGCGTTACCGTGGGCGTGTTCACCGAGGCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCTGTAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGACGCGGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGAGGACT  
TCGTGCTGCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0208  
Gen *katG*  
Mutación wild type

>fedora0208e\_KatG

GTGCCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTCGACTATGCCGCGGAGGTCGCGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCGCGCG  
ACTACGGCCACTACGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCGGCGCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTGCGCGCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGTTCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAGCGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGTCGGCCGCGGTGCAGATGGGGTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTCACTTTCCGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCAGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCAAGGACGGCGCGGTGCCGGCACCATCCCGACCCGTTCCGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCGCTGGTCCCAAGCAGACCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTTCGACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCATAGAGAAAGCAGCAAAGGCGGCTGGC  
CACAACATCACGGTGGCCTTACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGCAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCCGAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCCCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGCAGGACT  
TCGTGCTGCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0402  
Gen *katG*  
Mutación wild type

>fedora0402\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGGCGGCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTGCGGCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTGGGTTTGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAGTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGCTGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCAGAACCGGTAAAGACGCGATCACAGCAGCTCGATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCGACGAA  
ACGGGACAACAGTTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCCGGACCCGTTCCGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGTCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCCGCAAGGCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCCGCTGGTCCCAAGCAGACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTCGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTATTGCGACCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCGGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCCGCATAGAGAAAGCAGCAAAGGCGGCTGGC  
CACAAATCACGGTGCCCTTACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGGCGAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTCACCGAGGCCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCTGTGAGGACT  
TCGTCGCTGCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0409

Gen *katG*

Mutación S315T (AGC →ACC)

>fedora0409\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTTCGACTATGCCGCGGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCGGCGCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTTCGCGCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTTCGGGTTTCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGTCGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGCGGTGCACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTACACTTTCCGTAAGACCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCACCJGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCAAGGACGGCGCGGTGCCGGCACCATCCCGGACCCGTTTCGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCCGCTGGTCCCCAAGCAGACCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGG  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTTCGACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGGCGGCTGGC  
CACAACATCACGGTGGCCTTCACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGCAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCTGTGAGGACT  
TCGTCGCTGCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTTCGACGTGCGCTGA

Aislado 0605  
Gen *katG*  
Mutación S315T (AGC →ACC)

>fedora0605\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCCTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTCGACTATGCCCGGGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCCGGGCGGCGCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTCCGCGCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTCCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGGTTCCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGCTGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCACATTCCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTACACTTTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACACCAGCAGGTCGATGAGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCCGGACCCGTTCCGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCCGCTGGTCCCAGCAGACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCTGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTGCGACCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCGGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAAGGCGGCTGGC  
CACAACATCAGGTGCCCTTACCCCGGGCGCACGGATGCGTCGAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGCAGGACT  
TCGTGCTGCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

Aislado 0708

Gen *katG*

Mutación wild type

>fedora0708c\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTCGACTATGCCGCGGAGGTCGCGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCGGCCGCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTCCGCGCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTCCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGTTCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCACTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGATCTGGAGAACCCGCTGGCCGCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGCACATTCCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTCAACATTTCCGTAAGACCCATGGCGCGGGCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCAGCAACCGGTAAGGACGCGATCACAGCAGCATCGAGGTCGATGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACGCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCCGACCCGTTCCGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGTCGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCAATTCGACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCGGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGGCGGCTGGC  
CACAACATCAGGTGCCCTTCAACCCGGGCGCACGGATGCGTCGCAGGAACAAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGACAGATGGCTTCCGAAACTACCTCGGAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCTGTGAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTTCGACGTGCGCTGA



Aislado 0801  
Gen *katG*  
Mutación wild type

>fedora8881c\_KatG

GTGCCCAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCCGTCGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTCGACTATGCCGCGGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGCCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGGCGGCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTCCGCCCGCTTAACAGCTGGCCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTCCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGTTCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCGATGAGGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGTCGGCCGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCCATGGCCGCGGCGGTGACATTCGCGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTCAACATTCGGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGTAAGGACGCGATCACAGCAGCATCGAGGTCTGATGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCAAGGACGGCGCCGGTCCCGGACCATCCCGACCCGTTCCGGCGGGCCAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCCCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACTTGGGCGCTGGTCCCCAAGCAGACCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTACGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGCTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTTCGACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGGCGGCTGGC  
CACAACATCACGGTGCCCTTCACCCGGGGCGCACGGATGCGTCGAGGAACAAACGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCCGAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTCACCGAGGCCCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCGTGAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGCAGGACT  
TCGTGCTGCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTTCGACGTGCGCTGA

Aislado 1005  
Gen *katG*  
Mutación S315T (AGC →ACA)

>fedor**p**1005\_KatG

GTGCCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGAGCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCTGTGG  
GTCATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGCGGAAACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGT  
ACTGCACCAAAACCCGGCGTCTGCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTGACTATGCCGCGGAGGTGCGGACC  
ATCGACGTTGACGCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCGCCG  
ACTACGGCCACTACGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCACGCTGCCGGCACCTACCGCATCCACGA  
CGGCCGCGGCGGCGCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTGCGCGCGCTTAACAGCTGGGCCGACAACGCCAGC  
TTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAGTACGGCAAGAAGCTCTCATGGGCGGACC  
TGATTGTTTTTCGCCGGCAACTGCGCGCTGGAATCGATGGGCTTCAAGACGTTCCGGGTTCCGGCTTCGGCCG  
GGTCGACCAAGTGGGAGCCCAGTGAAGTCTATTGGGGCAAGGAAGCCACCTGGCTCGGCGATGAGCGTTAC  
AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAACCCTGTCGGCCGGGTGCAGATGGGGCTGATCTACGTGAACCCGGAGG  
GGCCGAACGGCAACCCGGACCCATGGCCGCGCGGTGACATTGCGGAGACGTTTCGGCGCATGGCCAT  
GAACGACGTCGAAACAGCGGCGCTGATCGTCGGCGGTCACTTTCCGTAAGACCCATGGCGCCGGCCCG  
GCCGATCTGGTCGGCCCCGAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGGGCTGGAAGAGCTCGT  
ATGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAAGCATCGAGGTCGTATGGACGAACACCCCGACGAA  
ATGGGACAACAGTTTCTCGAGATCTGTACGGCTACGAGTGGGAGCTGACGAAGAGCCCTGCTGGCGCT  
TGGCAATACACCGCAAGGACGGCGCGGTGCCGGCACCATCCCGGACCCGTTCCGGCGGCGAGGGCGCT  
CCCCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCGGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACGCGTCGCTG  
GCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCCGCAAGGCTGGTACAAGCTGATCCACCGAGACATG  
GGTCCCGTTGCGAGATACCTTGGGCGCTGGTCCCCAAGCAGACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTG  
CGGTCAGCCACGACCTCGTCGGCGAAGCCGAGATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATT  
GACTGTCTCACAGCTAGTTTCGACCGCATGGGCGGCGGCGTCTGCTGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGCGGC  
GGCGCCAACGGTGGTCGCATCCGCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATC  
TGCGCAAGGTCATTTCGACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGCGCGCGGGGAACATCAA  
AGTGTCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCGCCATAGAGAAAGCAGCAAGGCGGCTGGC  
CACAACATCAGGTGCCCTTACCCCGGGCCGACGGATGCGTCGAGGAACAACCGACGTGGAATCCT  
TTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTCGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGA  
GTACATGCTGCTCGACAAGGCGAACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTCGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGC  
CTGCGCGTCTCGGCGCAAACTACAAGCGTTACCGCTGGGCGTGTTACCGAGGCTCCGAGTCACTGA  
CCAACGACTTCTTCTGTAACCTGCTCGACATGGGTATCACCTGGGAGCCCTCGCCAGCAGATGACGGGAC  
CTACCAGGGCAAGGATGGCAGTGGCAAGGTGAAGTGGACCGGCAGCCGCGTGGACCTGGTCTTCGGGTCC  
AACTCGGAGTTGCGGGCGCTTGTGAGGTCTATGGCGCCGATGACGCGCAGCCGAAGTTCGTGCAGGACT  
TCGTCGCTGCCCTGGGACAAGGTGATGAACCTCGACAGGTTGACGTGCGCTGA

# **ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *katG*** **UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W**

H37Rv_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0402_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0202c_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0208e_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0708c_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0801c_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0409_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora1005_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
fedora0605_KatG	AAGAGCTCGTATGGCACC	CGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCAGCGGCATCGAGGTCGTA
	*****	*****

## Muestra H37Rv

Gen *rpoB*

Wild Type

>H37Rv\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTTAGTCCGAGTCGCCCGCAAAGTTCTCTGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACCGGCTCTCTTCGCTAAGCTCCGCAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCTGTTGCTCTGACCTCTGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTCGACGAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACCGCGCTCACTGTTCTGTCACCGCGAGTTCATCAACAACAACCCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGTGGCTGCCCGGGGTGTACTTCGACGAGACCAATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCCGCGCGCTGGCTCGAGTTTGACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTCCGGCTGCGCATCGACCGCAAACGCCGGAACCGGTCACTGCTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGGACGAGCGAGCAGATTGTCGAGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGCAACACCGCTCGGCACCGACGAGCGCTGTTGGACATCTACCGAAGCTGCGTCCGGCGAGCCC  
CCGACCAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTTGGAATACTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCCC  
GCGTGGTCTGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGCTGCTGTCGGCGAGCCCATCACGTCGTCGACGCT  
GACCGAAGAGACGTCGTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGCTTGACAGAGGTCAGACCAGATGACC  
GTTCCGGGCGGCGTCCGAGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTGCGTA  
CGGTGGCGAGCTGATCCAAAACAGATCCGGTCCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCACTCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGCTGGTCCGCCG  
ATCAAGGAGTCTTCCGGCACCGCAGCTGAGCCAATTCATCGACAGAACACCCGCTGTCGGGGTTGA  
CTCACAGCGCCGACTTCGCTGGGGCCCGCGGCTGTGALGTTGAGCGTCCCGGGCTGGAGGTTCCG  
CGACGTGCACTCGTCGACACCGCCGAGTGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGCTGTGCTGACGCGGGTCAACCGTTCGGGTTTCATCGAAACGCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACTGACCGCCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGCACA  
GGCCAATTCCGCCGATCGATCGGACGGCTCGCTTCGTCGAGCCGCGCTGCTGGTCCGCCGAAGCGGGC  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTCGTCTGAGGTGGACTACATGGACGTCCTGCCCGCCAGATGGTGTGGTGG  
CCACCGCGATGATCTCTCTCGGAGCACGACGACGCCAACCGTCCCTCATGGGGGCAACATCGACGCG  
CCAGGCGGTGCGCTGGTCCGTAGCGAGGCCCCGCTGGTGGGCAACGGGATGGAGCTGCGCGCGCGATC  
GACGCCGGCGACGTCGTGCTGCCGAAGAAAGCGGCTCATCGAGGAGGTGTGGCCGACTACATCACTG  
TGATGACGACAAACGGCACCCGGCTACTACCGGATCGCAAGTTTGGCCGGTCAACACGCGCACTTG  
GCTCAACAGTGGCCCATCGTGGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCGGTCAGGTGATCGCCGACGCTCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACCGGATCATCTGTCCAACCGCTGGTGAAGAGGACGTGCTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATCACCCGCGACATCCCGAACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGGCATCGGTGCCGAGGTTCCGACGGGG  
ACATCTGCTGGTGGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGGAGGAGCGGCTGCTGCTGC  
CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAAGGTGCGCACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGCATTTCGGGTGTTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCCGCCGCTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAAGGG  
CGTGATCGGCAAGATCTGCGGTTGAGGACATGCTGTTCTTCCGACGGGACCCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCTGCGCGGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGAGAGCCCACTGGGTTGGTGTG  
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCCCAAGGGGGTTCCGACTGGGCCGCCAGGCTGCCGACGAACT  
GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTCGACGCCGGTGTTCGACGGCGCCAGGAGGCGGAGCTGCAG  
GGCTGTTGTCTGTCACGCTGCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGGTGCAGGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTTCGACGGGCGAGCGGCGAGCCGTTCCCGTACCCGGTCACGGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT  
GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCAGCCG  
CTGGGCGGTAAAGGCGAAGTTCCGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCCATGACGGCTACG  
GTGCTGCTACACCTGCAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCCCGGTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGCTCAAGGGTGAGAACATCCCGAGCCGGGCACTCCCGAGTCTTCAAGGTGCTGCTCAAA  
GAATGCACTGCTGTGCTCAACGTCAGGTGCTATCGAGTGACGGTGGCGGATCGAACTGCGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGCAACGAATCCGAAG  
TGTCGAGGATCTTGCCTAA

**Mutación D516F (GAC→TTC)**

TTGGCAGATATCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTCTAGTCCGAGTCCGCCCAAGGTTCTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAAACCGGCTCTCTCTGCTAAGCTCCGCGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTGTTTCGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTTGGAAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTGCTGTTGCTTCTGACCTGCTTTCGACGATGTCAAGGACCCGTCGACGAGTGC  
AGCAAGGAGCATGACGTACCGCGCTCTACTGTTCTGTCACCGCGAGTTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGTGGCGTCCGCCGGGTGTACTTCGACGAGACATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCGAGGCCGCGCGCGTGGCTCGAGTTTACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTCGGCGTGCGCATCGACCGCAACGCCGGCAACCCGGTCGCTGCTGCTCAAGG  
CGCTGGGTGGACGAGCGAGGATGTGCGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATCGATGCTGACGCTGGGA  
GAGGACAACACCGTCCGACCGACGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGAAGCTGCTCCGGGCGAGCCC  
CCGACCAAGAGTCAAGCGACAGCTGTTGGAAACTTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCCC  
CGCTCGGTGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGCTGCATGTCGGCGACCCATCACGTGTCGACGCT  
GACCGAAGAAGACGTGCTGGCCACCATTGGAATATCTGGTCCGTTGACGAGGGTCAGAACCGATGAC  
GTTCCGGGCGCGTGGAGTCCGGTGGAAACGACGACATCGACACTTCGGCAACCCGCCCTCGCTA  
CGGTGGCGAGCTGATCAAAACAGATCCGGGTGGCATGTGCGGATGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCGAGGATGGAGCGCATCACACCGCAGACGTTTATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCG  
ATCAAGGAGTTCTTCGACACGAGCGAGCTGAGCAATTATTCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGA  
CCCAAGCGCCGACTGTGCGCGCTGGGGCCCGCGGCTGTGACGTGAECGTGCCGGGCTGGAGGTTCCG  
CGACGTGCACCCGTCGACTACGGCCGGATGTGCCCGATCGAAACCCCTGAGGGGGCCAACTCGGTCTG  
ATCGGCTCGTGTGCTGACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGGTTCATCGAAACCGCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGCGCTGGTTAGCGACGAGATGTTACTGTACCGCCGACGAGGAGACCGCCACTGCTGGTGGCACA  
GGCAATTCCCGCATGATGCGGACGGTCTGTTCTGTCGAGCCGCGCTGCTGGTCCGCCGAAGCGGGG  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGACGTCCTGCCCCGCCAGATGGTGTGCGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCTTCTGAGGACGACGACGCCAACCGTCCCTCATGGGGGCAACATGACAGCG  
CCAGGCGGTGCCGCTGGTCCGTCGAGCGAGGCCCCGCTGGTGGGCAACGGGAGGAGCTGCGCGCGCGATC  
GACGCCGGCGACGTCGCTGCGCGGAAGAGCGGCTCATCGAGGAGTGTGCGGCCACTACATCATCTG  
TGATCCACGACACGACGGCACCGCGTACTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGTCCAAACACGGCACTTG  
CGCAACCAAGTGCCCATCTGTCGACGCGGGGACCGAGTCGAGGCGGTCAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGAGCGATCATCTGTCCAACCGCTGGTCGAAGAGGACGTGCTCACCTGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGGACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATACCCGCCACATCCCGAACATCG  
TCCGACGAGGTCTCGCGACTTGGATGAGCGGGCGGATGTGCGCATCGTGTCGAGGTTCCGACGGGG  
ACATCTGGTGGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGAGGAGCGGCTGCTGCTGCG  
CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGCGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCAATCCGGCAAG  
GTGATGGCATTTCGGGTGTTTTCCCGGAGGACGAGGACGAGTTGCCCGCCGCTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCGGACGGCAACAGGG  
CGTGAATCGGCAAGATCTGCCGTTGAGGACGAGTCCGTTCTTCCGACGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCAACGGGCTGCGCGGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAGACCACCATCTGGGTGGTGTG  
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCCGCCAGGCTGCCGACGAACT  
GCTCGAGGCGGAGCCGAACGCCATTGTGTCGACGCCGGTGTTCGACGGCGCCGAGAGGCGAGCTGACG  
GGCTGTTGTGCTGACGCTGCCAACCGCGAGGTGACGCTGCTGGTGCACGCCGACGGCAAGGCCATGCT  
TCTTCGACGGGCGAGCGGCGAGGCTTCCCGTACCCGGTACGGTGGCTGATGATCATCATGAAGCT  
GCACACTCTGGTGGACGACAGATGCTCACGCCGCTCACCGGCGGACTCATGATGATCCACGAGGCGG  
CTGGCGGTAAGGCGCAGTTCCGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAAGTCTGGGCGATGACGGCTACG  
GTGCTGCCACACCTCGCAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCGCGCTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGCTCAAGGGTGAGAACATCCCGGAGCGGGCATCCCGAGTCTGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
GAACGTGACGTGCTGTCCTCAACGTCGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGCGGCGATCGAACTGCGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACATGGAGCGGGCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGAACGAATCCGCAAG  
TGTGAGGATCTTGGCTAA

Aislado 0208  
Gen *rpoB*  
Mutación D516F (GAC→TTC)

```
>fedo a0208e_RpoB
TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCCGCAAAGTTCTCGAATA
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGTCTCCTTCGCTAAGCTGCGCGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTCGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT
CCGGGTGATGTGTTGTCGTTCTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTCGACGAGTGCAA
AGACAAGGACATGACGTACGCGGCTCCACTGTTTCGTCACCGCCGAGTTCATCAACAACAACACCGGTGAG
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTTCATCATCAACG
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCCAGCTGGTGGGTCGCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCATTGACAA
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCGAGCCGCGGGCGGTGGTCGAGTTTGACGTC
GACAAGCGCGACACGTCGGCGTGCATCGACCGCAACGCCCGCAACCGGTACCGTGTGCTCAAGG
CGCTGGGCTGGACAGCGAGCAGATTGTGAGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA
GAAGGACAAACGCTCGGCACCGACGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGAAGCTGCGTCCGGGCGAGCCC
CCGACCAAGCAGCTACGCGACGAGCGCTGTTGGAAAACCTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACTGCGCC
CGCTCGGTGCTATAGGTCAACAAGAAGCTCGGGTGCATGTGCGCGAGCCATCACGTGTCGACGCT
GACCGAAGAAGACGCTGTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGTTGACGAGGGTCAGACCACGATGACC
GTTCCGGGCGGCGTGGAGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCGCTGCGTA
CGGTCGGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGGTCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG
GATGACCAACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCG
ATCAAGGAGTTCTTCGGCACCGAGCGAGTGAACCAATTCTTTC .AGAACAACCCGCTGTGCGGGTTGA
CCACAGCGCCGACTGTGTCGGCTGGGGCCCGCGGCTGTGTCACGTGAGCGTGGCGGGCTGGAGTCCG
CGAGCTGACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG
ATCGGCTCGTGTGCGGTGACGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTCTATCGAAACGCCGTACCGCAAGGTGG
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACTGACCGCGACGAGGAGGACCGCCACGTGGTGGCACA
GGCCAAATTCGCCGATCGATGCGGACGGTGGCTTCGTCGAGCCGCGCGTGTGGTCCGCCGCAAGGCGGG
GAGGTGGAATACGTGCCCTCGTCTGAGGTGGACTACATGGACGCTCTCGCCCGCAGATGGTGTGGTGG
CCACCGCGATGATTCCTTCCTGGAGCAGCAGCGCAACCGTGGCTCATGGGGGCAACATGCAAGCG
CCAGCGGTGCGCGCTGGTCCGTAGCGAGGCCCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGTGGCGCGCGGCGATC
GACGCCGCGCAGCTGTGTCGCGCAAGAAAGCGGCGTCATCGAGGAGGTGTGGCCGACTACATCACTG
TGATGCACGACAACGGCACCCGGCGTACCTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGGTCAACCAAGGCACTTG
CGCCAACCACTGCCCCATCGTGGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCGGGTCAGGTGATCGCCGACGTTCCC
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCGTGGGAGGGCCACA
ACTACGAGGACCGGATCATCTGTCAACCGCTGGTGAAGAGGACGTGCTACCTCGATCCACATCGA
GGAGCATGAGATCGATGCTCGGACACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATCAACCGCGACATCCGAAACATC
TCCGACGAGGTGCTCGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGGCATCGGTGCCGAGGTTCCGCGAGGGG
ACATCTGTGTCGGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGAGGAGCGGCTGCTGCGTGC
CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGCGACATTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG
GTGATCGGCATTCCGGTGTTCCTCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAGGG
CGTATCGGCAAGATCTGCGGTTGAGGACATGCGTTCCTTGGCGACGGCACCCGGTGGACATTATT
TTGAACACCCACGGCGTGGCGGACGAGATGAACATCGGCGAGATTTTGGAGACCCACCTGGGTTGGTGTG
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCGCAAGGGGTTCCGACTGGGCGCGCAGGCTGCCGACGAAC
GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTGACGCGGGTGTGACGGCGCCAGGAGGCGGAGCTGCAG
GGCTGTGTGTGTCGTCACGCTGCCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGGTGCACGCCGACGGCAAGGCGATGC
TCTTCGACGGGCGACGGCGAGCGTTCCCGTACCCGGTCAAGGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT
GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCAGCCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCAACAGCAGCGG
CTGGGCGGTAAAGGCGAGTTCCGGTGGCGAGCGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCGATGACGGCTTACG
GTGCTGCTACACCTGCAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCCGGCCGCGTCAAGGTGTA
CGAGGCGATGTCAGGGGTGAGAATCCCGGAGCCGGGATCCCGAGTCTGTTCAAGGTGCTGCTCAAA
GAATGCAAGTCTGTGCTCAACGTCGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGGCGCGATCGAATGCGCGAAG
GTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGCAACGAATCCGCAAG
TGTGAGGATCTGCGTAA
```

Aislado 0402

Gen *rpoB*

Mutación S531L (TCG→TTG)

>fedora0402\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCCGCAAAGTTCCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGTCTCCTTCGCTAAGCTGCGCGAACCACCTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCATTGTTTCGAGTGGCTGATCGGTTCCCGCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCAGTGGGTGGCCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTGTTGTCTGTTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTGACGAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACGCGGCTCACTGTTTCGTCACCGCGAGTTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAATCAGACGGTGTTCATGGGTGATTCGCCGATGATGACCGAGAAGGGACGTTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAGCGAGTGGTGGGTCGCCCGGGGTGTACTTCGACGAGACCATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCGCGGCGGTGGTCTGAGTTTGACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTCCGGCTGCGCATCGACCGCAACCGCGCAACCGGTACCGTGTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGGACGAGCAGCAGATTGTCGAGCGGTTCCGGTTCCTCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCCGACCGACGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGAAGCTGCGTCCGGGCGAGCCC  
CCGACCAAAGATCAGCGCAGACGCTGTTGGAAAACTTGTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCC  
GCGTCGGTGGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGTGCATGTCGGCGAGCCCATCACGTCGTGACGCT  
GACCGAAGAAGACGTCGTGGCCACCATCGAATATCTGGTTCGCTTGACGAGGGTCAGACCACGATGACC  
GTTCCGGGCGGCGTCGAGGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTGCGTA  
CGGTCGGCGAGCTGATCAAAACGAGATCCGGGTCGGCATGTGCGGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCG  
ATCAAGGAGTTCCTCGGACCGACGAGCTGAGCCAATTTCATGGACGAGAACAACCCGCTGTGCGGGTTGA  
CCACAAGCGCCGACTTTTGCGCTGGGGCCCGGGGCTGTGTCAGTGAGCGTGCCTGGGTCGAGGTTCCG  
CGAGTGCACCCGTGCACTACGCGCGGATGTGCGCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGCTCTG  
ATCGCTCGCTGTGCGGTGACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTCATCGAAACGCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGCACA  
GGCCAATTCCCGATCGATGCGGACGGTGCCTTCGTCGAGCCGCGGCTGCTGGTCCGCCGAAGGCGGGC  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTCGTCTGAGGTGGACTACATGGACGTCCTGCCCCGCCAGATGGTGTGCGGTG  
CCACCGCGATGATTCCTTCCTGGAGCAGCAGCGCCCAACCGTGCCTTCATGGGGGCAACATGACGCG  
CCAGGCGGTGCCGTGGTCCGTAGCGAGGCCCCGCTGGTGGGCAACGGGATGGAGTGGCGCGGGGATC  
GACGCCGGCGAGCTGTCGTGCGCGAAGAAAGCGGCTCATCGAGGAGGTGTGCGCCGACTACATCACTG  
TGATGCAAGACCAAGGACCCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGGTCCAACCACTGCGATTCG  
CGCCAACAGTGCCCCATCGTGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCCGTCAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACGCGATCCTGTCCAACCGCCTGGTCAAGAGGACGTGCTCACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATCACCCGCGACATCCCGAACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCCGACCTGGATGAGCGGGGATCGTGCGCATCGGTGCCGAGGTTCCGACGGGG  
ACATCTTGGTCCGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGTCGACGCCGGAGGAGCGGCTGCTGCTGC  
CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGCGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGCATTCCGGGTGTTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGCTGACAAGCTGGCCGGCGGCGACGGCAACAAGGG  
CGTGATCGGCAAGATCTGCGCGTTGAGGACATGCCGTTCTTGCCGACGGCACCCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGCCTCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAGACCACTCGGTTGGTGTG  
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCCGCCAAGGGGTTCCGACTGGGCGCCAGGCTGCCGACGAACCT  
GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTGACGCCGGTGTTCGACGGCGCCAGGAGGCGAGCTGACG  
GGCTGTGTGCTGTCACGCTGCCAACCGCGAGGTGACGTGCTGCTGACGCCGACGGCAAGGCCATGC  
TCTTCGACGGGCGAGCGCGGAGCGTTCCGTAACCGGTACGGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT  
GCACCACTGTGTGACGACAAGATCCACGCCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCAGCG  
CTGGGCGGTAAAGGCGAGTTCGGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCGATGACGGCTACG  
GTGCTGCTTACACCTGCGAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCCGGCGGCTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGTCGAAGGTGAGAACATCCCGAGCGGGCATCCCCGAGTGTTCGAAGGTGCTGCTCAA  
GAAGTGCAGTGTGCTTCAACGTGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGGCGGATCGAAGTGGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGAACGAATCCGAAG  
TGTCGAGGATCTTGGCTAA

**Mutación S531L (TCG→TTG)**

TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTCTAGTCCGAGTCGCCCGAAAGTCTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGTCTCTCTTCTGCTAAGCTGCGCGAACCACTTGAGGTTGCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTCCAGTGGGTGATCGTTTCGCCGCGCTGGCGCGAATTCGCCCGCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTTGGAAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGTGGATGTCTGTTGCTGTTCTCTGACCCCTGTTTCGACGATGTCAAGGACCCCGTCGACGAGTGCAA  
AGCAAGGACATGACGTGACCGGCTCCACTGTTCTGCTACCGCCGAGTTATCAACAACAACACCGTGTAG  
ATCAAGAGTCAGACGAGTGTCTATGGGTGACTTCCCGATGATCGAGAGAGGACACGTTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCTGTGGTGGTCAGCAECTGGTGGGTGCGGTCGCCGGGTGTACTTCGACGAGACCATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCCAGCGCGGGCGGTGGCTCGAGTTTGACTG  
GACAAGCGCGACACCTGTCGGCTGCGCATCTGACCGCAAAACGCCGGCAACCGGTACACGTGCTGCTCAAG  
CGCTGGGTGGACGAGCGAGAGATTGTGAGCGGGTTCGGGTCTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCCGACCCGACGAGGCGTGTGGACATCTACCGCAAGCTGCTCTCGGGCGAGCC  
CGGCTCAAGAGTTCAGCGACAGCTGTGGAAAGTTGTTTCAAGGAGAAGCGCTACGACTCGGCC  
CCGATCGGTCTGCTATAAGGTCAACAGAAGTCTGGGCTGCTATGTCGGCGAGCCCATCACGTCTCGACGCT  
GACCGAAAGACGTCTGGCCACCATCGAATATCTGGTTCGCTTGCACGAGGGTCAGACCACGATGACC  
GTTCCGGCGGCGTGGAGTGGCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCGCTGCGTA  
CGGTGCGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGGTGGCATGTGCGCGATGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCG  
ATCAAGGAGTCTTCGGCACCGACAGCTGAGCCAATTCATGGACAGAAACCCGCTGTGCGGGTTGA  
CCACAAGCGCCGACTTTCGCTGGGGCCGGCGGCTGTCGATGAGCTGAGCTGCGCGGCTGGGCTCG  
CGACGTGACCCGCTGCACTACCGCGGATGGCCGATCGAAACCTCGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGTGTGCTGACGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATGTGTACTGACCGCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGCACA  
GGCCAATTCGCGCATCGATCGGACGGTCTGCTGTCGAGCGCGCGTGTGGTCCGCCGCAAGGCGGG  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTCGTCTGAGGTGGACTACATGGACGTCTCGCCCCCGCAGATGGTGTGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCTTCTGAGGACGACGACGCCAACCGTCCCTCATGGGGGCAACATCGACGCG  
CCAGGCGGTGCGCTGCTGCTGTCAGCGGCCCTCGCTGGTGGCGACCGGATGGAGTGGAGTGGCGCGCGGATC  
GACGCGCGCGACGTCTGCTGCGCGAAGAAGCGCGCTGTCAGGAGGTGTGCGGCCACTACATCACTG  
TGATGACGACAACGGCACCCGGCTACTACCGGATGCGCAAGTTTGCCGGTCCAACACGGCACTTG  
CGCAACCAAGTCCCCATCTGGACGCGGGCGACGAGTCGAGGCGGGTCAGGTGATCGCGACGGTCCC  
TGATGACGACGCGCGAGATGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACCGCATCTCTGTCCAACCGCTGGTGAAGAGGACGTGCTCACTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGTCATGCTCGCACCAAGCTGGGTGGCGAGGAGATCACTCCGACATCCCGCAACTC  
TCCGACGAGGTGCTCGCGACTGGATGAGCGGGGATCGCTGCGCATCTGGTGGAGGTTTCCGACGGG  
ACATCTGCTGGCGAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCCGAGGAGCGGCTGCTGCTG  
CATCTTCGCTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGCATTGGGTGTTTTCCCGGAGGACGAGGACGAGTTGCGGGCGGTGTCAACGACTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACCGAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCGGGCGGACCGGCAACAGGG  
CTGATCGGCAAGATCTGCGGTGAGGACATCGCTTCCGCTTGGCGAGGACCCCGGTGGACATATT  
TTGAACGACACCGGCTGCGCGACGGATGAACATCGGCTCAGTTTGGAGGACCACTCTGGGTTGGTGT  
CCCAAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCCAAAGGGGTTCCGACTGGGCGCGAGGCTGCGCGACGAACT  
GCTGAGGCGCGAGCGAACGCCATTGTGTCGACCGGGTTCGACGGCGCGCAGGAGGCGGAGCTGAG  
GGCTGTGTGTCGTCACGCTGCCAACCGCGACGGTGTGCTGGTGCAGCGCGACGGCAAGGCAATG  
TCTTCGACGGGCGAGGCGGAGCGTTCCGATCCCGGTCGCGGCTGGCTGCTACATGTACATCATGAGCT  
GCACCACTGGTGGACAGCAAGATCCAGCGCCGCTCACCGGCGCTGCTCATGATACCCGACAGCGCG  
CTGGGCGGTGAAGGCGAGTTGGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAAGTCTGGGCTATGAGGCTACG  
GTGCTGCTACACCTGAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCGCGTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGTCAGGGGTGAGAACATCCGAGGCGGGGATCCCGAGTCTGTCAGGTTGCTGCTCAA  
GAATGCACTGCTGTGCTCAACGTGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGGCGGATCGAACTGCGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACGTGGAGCGGGCGCGCCCAACTGGGAATCAATCTGTCGCCCAAGAACTCCGCAAG  
GTGCGAGGATCTTCGCTAA



Aislado 0605

Gen *rpoB*

Mutación H526D (CAC→GAC)

>Fedora0605\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCCGAAAGTTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGTCTCTTTCGCTAAGCTGCGCGAACCACCTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTTGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTGATGTCTGTTCTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTGACGAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACGGGCTCCTGTTGTCACCGCCGAGTTTCATCAACAACACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACCGTGTTCATGGTGACTTCCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCGTGTGGTGTGACCGAGCTGGTGCCTGCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCGCGGCGCTGGCTCGAGTTTGACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTCCGGCTGCGCATCGACCGCAACGCCGCAACCGGTACCGTCTGCTCAAGG  
CGCTGGGCTGGACCGAGCAGATTGTGAGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCCGACCGACGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGCTCCGGGCGAGCCC  
CCGACCAAGAGTCAAGCGCAGACGCTGTTGGAAAATTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCCC  
GCGTGGTCTGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGTGCATGTGCGCGAGCCCATCACGTCGTCGACGCT  
GACCGAAGAAGAGCTGTTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGCTTGACGAGGGTCAGACACGATGACC  
GTTCCGGGCGCGCTCGAGGTGCCGTTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTGCGTA  
CGGTCCGGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGTCCGATGTGCGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACCGAGAGTGGAGGCGATCACACCGAGACGTTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCCCGCG  
ATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACGAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGA  
C GAC TAGCGCCGACTGTCCGCGCTGGGGCCCGCGGCTGTGTACGTGAGCGTCCGGGCTGGAGTCCG  
CGACGTGACCCGCTCGCACTACGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGCTGTGCGGTACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGCAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGACA  
GGCAATTCCCGATCGATCGGACGGTCTGCTGTCGAGCCGCGCTGCTGGTCCGCGCAAGGCGGG  
GAGGTGGAGTACGTGCTCTGTCGAGTGGACTACATGGACGTCCTGCCCGCGAGATGGTGTGCGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCTTCTGGAGCACGACGACGCCAACCCTGCTCATGGGGCAACATGACGCG  
CCAGGCGGTGCCGTGGTCCGTAGCGAGGCCCGCTGGTGGGACCGGGATGGAGTGGCGCGCGCGATC  
GACGCCGGCGACGTCTGTCGCCGAAGAAAGCGGCTCATCGAGGAGGTGTGGCGACTACATCACTG  
TGATGACGACAACCGGACCCGGCGTACCTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGGTCCAAACACCGGCACTTG  
CGCAACCACTGCCCCATCGTGGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCCGTCAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACCTGCTGGTGGCCATCATGCTGGTGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACCGGATCATCTGTTCCAACCGCTGCTCGAAGAGGAGCTGCTACCTCGATCCACATCGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACACCAAGCTGGTGGCGAGGAGATCACCCGCGACATCCGAACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCCGACCTGGATGAGCGGGCATCTGCGCATCGGTGCCGAGGTTCCGACGGGG  
ACATCTGTGTCGGCAAGGTACCCCGAAGGTGAGACCGAGCTGACGCCGGAAGGAGCGGCTGCTGCTGTC  
CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGATTCGGGTGTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGCCCCGCGCGACGGCAACAAGGG  
CGTGATCGGCAAGATCTGCCGGTTGAGGACATGCCGTTCTTGGCGAGCGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGGCGGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAGACCCACTGGGTTGGTGTG  
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCCCGCAGGCTGCCCGACGAAT  
GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTGACGCGCGGTGTTGACGGCGCCAGGAGGCGAGCTGCAG  
GGCTGTTGTGTGACGCTGCCCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGCTGACGCCGACGGCAAGGCCATGCT  
TCTTCGACGGGCGCAGCGGCGGCGGTTCCCGTACCGGTCACGGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT  
GCACACCTGGTGGACGACAAGATCCACGCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCAGCGG  
CTGGGCGGTAAAGCGCAGTTCCGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCTATGACGGCTACG  
GTGCCCGCTACACCTCGAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTCCGGCGCGTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGCTCAAGGGTGAGAACATCCCGAGCGGGCATCCCGAGTCTGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
GAATGCACTGCTGTGCTCAACGTGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGGCGGATCGAACTGCGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACCTGAGCGGGCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGCAACGAATCCGCAAG  
TGTGAGGATCTTGGCTAA

Aislado 0708

Gen *rpoB*

Mutación H526D (CAC→GAC)

>fedora0788c\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCAGAGCAAACAGCCGCTAGTCCTAGTCCGAGTCGCCCGCAAAGTTCTCGAATA  
ACTCCGTACCCGGAGCGCAAACGGGTCTCTTCGCTAAGTCGCCGAACCACTTGAGGTTCCGGGACT  
CCTTGACGTCCAGACCGATTCTGTCGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGGCGCGAATCCGCCCGAG  
CGGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTCGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCGATCGAGGACTTCT  
CCGGGTCTGATGTCTGTCTGTTCTCTGACCTCGTTTCGACGATGTCAAGSCACCCGTCGACGAGTGCAA  
AGACAAGGACATGACGTACCGGCTCACTGTTCTGTCACCGCGAGTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTCCCGATGATGACCGAGAAGGGACGTTTCATCATCAACG  
GGACCGAGCTGTGTGGTCAAGTCAGCTGGTGGGTGCCCGGGGTGACTTCGACGAGACCATTGACAA  
GTCCACCGACAAGACGTGCACAGCTCAAGGTGATCCCGAGCCGCCGCGTGGCTCGAGTTTGACGTC  
GACAAGCGCGACACCGTCGGCTGCGCATCGACCGCAAACGCCGGAACCGGTACCGTGTCTGCTCAAGG  
CGCTGGCTGGACAGCGAGCAGATTGTCTGAGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
GAAGGACAACACCGTCGGCACCAGCAGGCGCTGTTGGACATCTACCGAAGCTGCTCCGGCGAGCCCC  
CCGACCAAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTTGGAAAACTTGTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACTGGCCCT  
GGCTCGGTCTCTATAAGGTCAACAAGAAGTCGGGCTGATGTGCGCGAGCCCATCACGTCTGTCGACGCT  
GACCGAAGAAGACGCTCTGGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGCTTGACAGGGGTGACACCATGATGACC  
GTTCCGGGCGGCGTCGAGGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGGCAACCGCCGCTGCGTA  
CGGTGGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGGTGGCATGTGCGGATGGAGCGGTGGTCCGGGAGCG  
GATGACCAACAGGACGTGGAGGCGATCACACCGAGACGTTGATCAACATCCGGCGGTGGTCCCGCG  
ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACAGAACAAACCGCTGTCCGGGGTTGA  
C) GAC. IAGCGCGACTGTCTGGCGCTGGGGCCCCGGCGCTGTCTGACGTGAGCGTGGCGGCTGGAGGTCCG  
CGACGTGACACCCGTCGCACTACGGCGGATGTGCTCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
ATCGGCTCGCTGTCTGGTACCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACCGCTACCGAAGGTGG  
TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACCTGACCGCGACGAGGAGGACCGCCACGTGGTGGACA  
GGCCAATTCGCGGATCGATGCGGACGGTCTGTTCTGTCGAGCGCGCGTGTGGTCCGCGCAAGGCGGGC  
GAGGTGGAGTACGTGCCCTCTGTCGAGGTGGACTACATGGAGGTCTCGCCCCCGCAGATGGTGTCTGGTGG  
CCACCGCGATGATTCCTTCTGGAGCAGCAGACGCCAACCGTGCCCTCATGGGGGCAACATGACGCG  
CCAGGCGGTGCGCTGGTCCGTAGCGAGGCCCGCTGGTGGGCAACGGGATGGAGCTGCGCGCGCGATC  
GACCGCGCGGACGTCTGTCGCGCGAAGAAGCGCGCTCATCGAGGAGGTGTGGCGGACTACATCATG  
TGATGCACGACAACGGCACCCGGCTACTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGGTCAACCAAGGCACTTG  
CGCCAACCAAGTGGCCCATCTGTGGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCGGTGAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
TGTACTGACGACGCGGAGATGGCGCTGGGCAAGAATCTGCTGGTGGCCATCATGCGGTGGAGGGCCACA  
ACTACGAGGACCGGATCATCTGTCCAACCGCTGGTGAAGAGGACGTGCTCACCTCGATCCATCTGA  
GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACCAAGCTGGGTGGGAGGAGATCACCGCGACATCCGAAACATC  
TCCGACGAGGTGCTCGCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGGCATCGGTGCGAGGTTCCGACGCGGG  
ACATCTGTGTGGCAAGGTCAACCCGAAGGGTGAGACCGAGCTGACGCGGAGGAGCGGCTGTGCGTGC  
CATCTTCGTGAGAGGCCCCGAGGGTGCGCGACACTTCGCTGAAGGTGCGCACGGCGAATCCGGCAAG  
GTGATCGGCATTCCGGTGTTCCTCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
GTGTGTATGTGGCTAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAGGG  
CGTGATCGCAAGATCTGCGGTGAGGACATGCCGTTCTTGGCGACGGCACCCGGTGGACATTATT  
TTGAACACCCACGGCGTGCCGCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTGGAGACCCACCTGGGTGGTGTG  
CCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCGCAAGGGGGTTCCGACTGGGCGCCAGGCTGCCGACGAAC  
GCTCGAGGCGCAGCGCAACGCTATTGTGTCACGCGGTGTTGACGGCGCCCAAGGAGGCGAGGTGACG  
GGCTGTTGTCTGTGACGCTGCCCAACCGCGACGGTGACGTGCTGGTGAAGCGCGACGGCAAGGCTATGC  
TCTTCGACGGGCGAGCGGCGAGCCGTTCCGTAACCGGTACGGTTGGCTACATGTATCATCATGAAGCT  
GCACCACTGGTGGAGACAAGATCCAGCCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCGAGCGCG  
CTGGGCGGTAAAGGCGAGTTCGGTGGCGAGCGTTCCGGGAGATGGAGTCTGGGCGATGCGAGGCTACG  
GTGCTGCTACACCTTCAGGAGCTGTTGACATCAAGTCCGATGACACCGTGGCGCGCTCAAGGTGTA  
CGAGGCGATGCTCAAGGTGAGAACATCCCGAGCGGGCATCCCGAGTCTGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
GAACTGACGCTGTGCTCTCAAGCTGAGGTGCTATCGAGTGACGCTGGCGGATCGAACGTCGCGAAG  
GTGAGGACGAGGACCTGAGCGGGCGCGGCCAACCTGGGAATCAATCTGTCCTCGCAACGAATCCGCAAG  
TGTCGAGGATCTTGGCTAA

Aislado 0801  
Gen *rpoB*  
Mutación Wild type

>fedora8881c\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCAGAGCAAAACAGCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCGCAAAGTTCTCGAATA  
 ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGGTCTCTTCGCTAAGCTGCGCGAACCATTGAGGTTCCGGGACT  
 CTTGACGTCCAGACCGATTCTGTCGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
 CGGGGTGATGTCAACCAAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCCGATCGAGGACTTCT  
 CCGGGTCGATGTCTGTTGTCGTTCTCTGATCCTCGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTCGACGAGTGCAA  
 AGACAAGGACATGACGTACCGGGCTCCACTGTTCTGTCACCGCCGAGTTTCATCAACAACAACCCGGTGAG  
 ATCAAGAGTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCCGATGATGACCGAGAAGGGACGTTTCATCATCAACG  
 GGACCGAGCGTGTGGTGCTCAGCCAGTGGTGCGGTCGCCCGGGGTGTACTTCGACGAGACCATTGACAA  
 GTCCACCGACAAGACGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCGAGCCCGGGCGCGTGGCTCGAGTTTGACGTC  
 GACAAGCGCGACACCGTCGGCGTGCGCATCGACCGCAACGCCGGCAACCGGTACCGTGTGCTCAAGG  
 CGCTGGGCTGGACGAGCGAGCAGATTGTCGAGCGGTTCCGGTTCTCCGAGATCATGCGATCGACGCTGGA  
 GAAGGACAACACCGTCGGCACCAGCAGGCGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGCGTCCGGGCGAGCCC  
 CCGACCAAGAGTCAAGCGAGACGCTGTTGGAAAACCTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCCC  
 GCGTCGGTCGCTATAAGGTCAACAAGAAGCTCGGGTGCATGTGCGCGAGCCATCACGTCGTGACGCT  
 GACCGAAGAAGACGTCGTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGTTGCACGAGGGTCAGACACGATGACC  
 GTTCCGGGCGGCGTCGAGGTGCCGGTGGAAACCGACGACATCGACCACCTTCGGCAACCGCCGCTGCGTA  
 CGGTCCGGCGAGCTGATCCAAACAGATCCGGTCCGCGATGTCGCGGATGGAGCGGGTGGTCCGGGACG  
 GATGACCACCCAGGACGTGGAGCGATCACACCGCAGACGTTTATCAACATCCGGCCGGTGGTCCGCCG  
 ATCAAGGAGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTTCATGACAGAACAACCCGCTGTCCGGGTTGA  
 CACACAGCGCCGACTGTCGCGCTGGGGCCCCGGCGTCTGTCALGTGAGCGTCCCGGGCTGGAGGTCCG  
 CGACGTGACCCGTCGCACTACGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
 ATCGGTCGCTGTGCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTCCGGTTTCATCGAAACGCCGTACCGCAAGGTGG  
 TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGACTGACCGCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGCACA  
 GGCCAATTGCGCGATCGATGCGGACGGTCCGTTCTGTCGAGCCGCGCTGCTGGTCCGCGCGCAAGGCGGGC  
 GAGGTGGAGTACGTGCCCTCGTCTGAGGTGGACTACATGGACGTCCTGCCCGCCAGATGGTGTGGTGG  
 CCACCGCGATGATTCCTTCTGGAGCACGACGACCCAACCGTGCCTTCATGGGGGCAACATGCAGCG  
 CCAGGCGGTGCCGCTGGTCCGTAGCGAGGCCCGCTGGTGGGCACCGGGATGGAGCTGCGCGCGGCGATC  
 GACGCCGGCGACGTCGTGTCGCCGAAGAAAGCGCGTCATCGAGGAGGTGTCCGCCGACTACATCACTG  
 TGATGCACGACAACGGCACCCGGCTACCTACCGGATGCGCAAGTTTGCCCGGTCCAACCACGGCACTTG  
 CGCCAACAGTGCCCATCTGTGACCGGGCGACCGAGTCGAGGCGGGTCAGGTGATCGCCGACGGTCCC  
 TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCCACA  
 ACTACGAGGACCGCATCATCTGTCTCAACCGCTGGTTCGAAGAGGACGTGCTACCTCGATCCACATCGA  
 GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACCAAGCTGGGTGCGGAGGAGATCACCGCGACATCCGAACATC  
 TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGCGCATCGGTGCCGAGGTTCCGCGACGGGG  
 ACATCTGGTCCGCAAGGTACCCCGAAGGTGAGACCGAGCTGACGCCGGAGGAGCGGTGCTGCGTGC  
 CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGCGACACTTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
 GTGATCGGCATTCCGGTGTTCCTCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCCGCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
 GTGTGATGTGGCTCAGAAACGCAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAAGGG  
 CGTGATCGGCAAGATCTGCCGGTTGAGGACATGCCGTTCTTGGCGACGGCACCCGGTGGACATTATT  
 TTGAACACCCACGGGTGCCGCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGGAGACCCACCTGGGTGGTGTG  
 CCCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCGCAAGGGGTTCCGGACTGGGCCGCCAGGCTGCCGACGAACT  
 GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTCGACGCCGCTGTTGACGGCGCCAGGAGGCCGAGTGCAG  
 GGCTGTTGTGCTGCACGCTGCCAACCAGCGACGGTGACGTGCTGGTGCACGCCGACGGCAAGGCCATGC  
 TCTTCGACGGGCGACGGCGAGCCGTTCCCGTACCCGGTACCGGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT  
 GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCCGCTCCACCGGGCCGTACTCGATGATCACCCAGCAGCCG  
 CTGGGCGGTAAAGGCGAGTTCGGTGGCCAGCGGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCCATGCAGGCCATCG  
 GTGTGCTTACACCTGCAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCCGCGTCAAGGTGTA  
 CGAGGCGATCGTCAAGGTGAGAATCCCGGAGCCGGGATCCCGAGTCTGTTCAAGGTGCTGCTCAA  
 GAACCTGCACTGCTGTGCTCAACCTGAGGTGCTATCGAGTGACGGTGCGGCGATCGAAGTGCAGGAG  
 GTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCCGCGCAACCTGGGAATCAATCTGTCCCGCAACGAATCCGCAAG  
 TGTGAGGATCTTGCCTAA

Aislado 1005  
Gen *rpoB*  
Mutación H526Y (CAC→TAC)

>fedora1005\_RpoB

TTGGCAGATTCCCGCCAGAGCAAAACASCCGCTAGTCTAGTCCGAGTCGCCCGCAAAGTTCTCGAATA  
 ACTCCGTACCCGGAGCGCCAAACCGGCTCTCTTCGCTAAGCTGCGCGAACCACCTTGAGGTTCCGGGACT  
 CCTTGACGTCCAGACCATTCTGTTCTGAGTGGCTGATCGGTTCCGCCGCTGGCGCGAATCCGCCGCCGAG  
 CCGGGTGATGTCAACCCAGTGGGTGGCTGGAAGAGGTGCTCTACGAGCTGTCTCGATCGAGGACTTCT  
 CCGGGTCGATGTCTGTTGCTCTCTGACCTCTGTTTCGACGATGTCAAGGCACCCGTCGACGAGTGCAA  
 AGACAAGGACATGACGTACGCGGCTCCACTGTTCTGTCACCGCCGAGTTCATCAACAACAACACCGGTGAG  
 ATCAAGAGTTCAGACGGTGTTCATGGGTGACTTCCGATGATGACCGAGAAGGGCACGTTTCATCATCAACG  
 GGACCGAGCGTGTGGTGGTCAAGCTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 GTCCACCGACAAGAGCTGCACAGCGTCAAGGTGATCCCGAGCCGCGGGCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 GACAAGCGCGACACCGTGGCGTGGCATCGACCGCAACCGCCGCAACCGGTACCGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 CGTGGGCTGGACCGAGCGAGATTGTGAGCGGTTCCGGTTCCTCGAGATCATCGATCGACGCTGGA  
 GAAGGACAACACCGTCCGCCACCGACGAGGCGCTGTTGGACATCTACCGCAAGCTGGCTCGGGCGAGCCC  
 CCGACCAAGAGTCAGCGCAGACGCTGTTGGAAAATTGTTCTTCAAGGAGAAGCGCTACGACCTGGCCC  
 GCGTGGTGGTCTATAAGGTCAACAAGAAGCTGGGCTGCATGTGGCGAGGCCATCACGTCGTGACGCT  
 GACCGAAGAAGAGCTGTGGCCACCATCGAATATCTGGTCCGCTTGACGAGGGTCAGACACGATGACC  
 GTTCCGGCGGGCTCGAGGTGCTGGTGGAAACCGACGACATCGACCACTTCGCAACCGCCGCTGCGTA  
 CCGTGGCGAGCTGATCAAAACAGATCCGGGTGGCATGTGCGGATGGAGCGGGTGGTGGGAGCG  
 GATGACCAACCGAGACGTGGAGGCGATCACACCGAGAGTGTATCAACATCCGGCCGGTGGTGGCCGG  
 ATCAAGGAGTTCCTCGCACAGCCAGCTGAGCCAAATTCATGGAACAGAACACCCGCTGTCGGGGTTGA  
 C TAC AAGCGCCGACTGTGCGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACGTGAGCGTGGCGGGCTGGAGGTCCG  
 CGACGTGCAACCGTGCACATCGGCCGGATGTGCCGATCGAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTG  
 ATCGGCTCGCTGTGGTGTACGCGCGGGTCAACCGTTCCGGTTTCATCGAAACCGCTACCGCAAGGTGG  
 TCGACGGCGTGGTTAGCGACGAGATCGTGTACTGACCGCCGACGAGGAGGACCGCACGTGGTGGCACA  
 GGCCTAATTCGCGATCGATCGGACGGTCTGCTTCTGAGCGCGCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 GAGGTGGAGTACGTGCCCTGCTGAGGTGGACTACATGGAGCTCTGCCCCGCCAGATGGTGTGGTGG  
 CCACCGCGATGATTCCTTCTGGAGCAGCAGCAGCCAAACGTGCCCTCATGGGGGCAACATGCAGCG  
 CCAGCGGGTGGCGTGGTCCGTAGCGAGGCCCCGTGGTGGGACCGGGATGGAGTGGCGCGGGGATC  
 GACGCCCGCGACGTGTCGTGCGCCGAAGAAGCGCGTATCGAGGAGGTGTGCGCGACTACATCTG  
 TGATGACGACAAACCGCACCCGGGCTACTACCGGATCGCAAGTTTGCCCGGTCAACACAGGCACTTG  
 CGCAACAGTGCCCCATCTGTGGACCGGGCGACCGAGTCCAGGCGGGTCAAGTGATCGCCGACGGTCCC  
 TGTACTGACGACGGCGAGATGGCGCTGGGCAAGAACTGCTGGTGGCCATCATGCCGTGGGAGGGCACA  
 ACTACGAGGACGCGATCATCTGTCCAACCGCTGGTGGAGAGGAGTGTCACTCGATCCACATCGA  
 GGAGCATGAGATCGATGCTCGCGACACCAAGCTGGGTGGGAGGAGTACCCGCGACATCCGAACATC  
 TCCGACGAGGTGCTGCCGACCTGGATGAGCGGGCATCGTGCATCGGTGCCGAGGTTCGCGACGGG  
 ACATCTGGTGGCAAGGTCAACCCGAAGGTGAGACCGAGTGAACCGGAGGAGCGGCTGCTGCTGC  
 CATCTTCGGTGAGAAGGCCCGCGAGGTGCGCGACATTCGCTGAAGGTGCCGACGGCGAATCCGGCAAG  
 GTGATCGGCATTTCGGGTGTTTTCCCGCGAGGACGAGGACGAGTTGCCGGCCGGTGTCAACGAGCTGGTGC  
 GTGTGTATGTGGCTCAGAAACGAAGATCTCCGACGGTGACAAGCTGGCCGGCCGGCACGGCAACAAGGG  
 CGTGATCGGCAAGATCTGCCGGTTGAGGACATGCCGTTCTTGCCGACGGCACCCCGGTGGACATTATT  
 TTGAACACCCACGGCGTGC CGCGACGGATGAACATCGGCCAGATTTTGAGAGCCACCTGGGTTGGTGTG  
 CCCACAGCGGCTGGAAGGTGACGCGCCGAAGGGGTTCCGGACTGGGCCCGCAGGCTGCCGACGAAT  
 GCTCGAGGCGCAGCCGAACGCCATTGTGTGACGCGGTTGTTGACGGCGCCAGGAGGCCAGCTGCAG  
 GGCTTGTGTGCTGACGCTGCCAACCGCGACGGTGAAGTGTGTTGACGGCGCCAGGAGGCCAGCTGCAG  
 TCTTGCAGGGGCGACGGCGGCGAGCGTTCCTGACCGGTCAAGTTGGCTACATGTACATCATGAAGCT  
 GCACCACTGGTGGACGACAAGATCCACGCCCGCTCCACCGGGCGTACTCGATGATCACCCAGCAGCCG  
 CTGGGCGGTAAAGGCGAGTTCGGTGGCGAGCGTTCCGGGAGATGGAGTGTGGGCCATGCAGGCCATCG  
 GTGCTGCCATACACCTGCAGGAGCTGTTGACCATCAAGTCCGATGACACCGTGGCCGGTCAAGGTGTA  
 CGAGGCGATGTCAGGGTGAGAATCCCGAGCGGGCATCCCGAGTCTTCAAGGTGCTGCTCAA  
 GAAGTGAAGTGTGCTCAACGTGAGGTGCTATCGAGTGAAGTGGCGGATCGAATGCGCGAAG  
 GTGAGGACGAGGACCTGGAGCGGGCCGCGCCAACTGGGAATCAATCTGTCCGCAACGAATCCGAAG  
 TGTGAGGATCTTGGTAA

## ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *rpoB* UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W

### Mutación 531

<i>fedora0605_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0708c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora1005_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCTACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0801c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0402_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0409_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>H37Rv_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0202c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0208e_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG

\*

\*

\*

### Mutación 526

<i>fedora0605_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0708c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCGACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora1005_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCTACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0801c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0402_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0409_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTTGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>H37Rv_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0202c_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG
<i>fedora0208e_RpoB</i>	TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGCCCGCGGTCTGTACAGTGAG

\*\*

\*

### Mutación 516

<i>fedora0605_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0708c_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora1005_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0801c_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0402_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0409_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>H37Rv_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0202c_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGTTCCAGAACAACCCGCTG
<i>fedora0208e_RpoB</i>	ATCAAGGAGTTCTTCGGCACAGCCAGCTGAGCCAATTCATGTTCCAGAACAACCCGCTG

Muestra H37Rv

Gen inhA

Wild Type

>H37Rv\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGCATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCCTACAACTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGTGGCGCGGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCCAATTGCTCTAG

Aislado 0202

Gen inhA

Mutación Wild Type

>fedora0202c\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGCATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCCTACAACTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGTGGCGCGGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCCAATTGCTCTAG

Aislado 0208  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

>fedora0208e\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACC GG GTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACCTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCAATTGCTCTAG

Aislado 0402  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

>fedora0402\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACC GG GTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACCTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGCACACCAATTGCTCTAG

Aislado 0409  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

>fedora0409\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACCGGGTTTGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGCATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTTACAACCTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGGGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGACACCCAATTGCTCTAG

Aislado 0605  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

>fedora0605\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACCGGGTTTGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGCATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTTACAACCTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAA  
TCTCGTTGCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGGGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCCGCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGGCGCGACACCCAATTGCTCTAG



**Aislado 0708**  
**Gen *inhA***  
**Mutación Wild Type**

**>fedora0708c\_InhA**

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGATG  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCC  
GGAGGTTTCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTTGAA  
TCTCGTTGCCGACGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACCACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGCGCGCACACCCAATTGCTCTAG

**Aislado 0801**  
**Gen *inhA***  
**Mutación Wild Type**

**>fedora0801c\_InhA**

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATCACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGGTGGTGATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCC  
GGAGGTTTCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCTACAACGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTTGAA  
TCTCGTTGCCGACGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCGCCAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACCACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGCGCGCACACCCAATTGCTCTAG

Aislado 1005  
Gen inhA  
Mutación Wild Type

>fedora1005\_InhA

ATGACAGGACTGCTGGACGGCAAACGGATTCTGGTTAGCGGAATCATCACCGACTCGTCGATCGCGTTTC  
ACATCGCACGGGTAGCCAGGAGCAGGGCGCCAGCTGGTGCTCACCGGGTTCGACCGGCTGCGGCTGAT  
TCAGCGCATACCGACCGGCTGCCGGCAAAGGCCCGCTGCTCGAACTCGACGTGCAAAACGAGGAGCAC  
CTGGCCAGCTTGGCCGGCCGGGTGACCGAGGCGATCGGGGCGGGCAACAAGCTCGACGGGTGGTGATT  
CGATTGGGTTTCATGCCGAGACCGGGATGGGCATCAACCGTTCTTCGACGCGCCCTACGCGGATGTGTC  
CAAGGGCATCCACATCTCGGCGTATTCTGATGCTTCGATGGCCAAGGCGCTGCTGCCGATCATGAACCC  
GGAGGTTCCATCGTCGGCATGGACTTCGACCCGAGCCGGGCGATGCCGGCCTACAACCTGGATGACGGTCG  
CCAAGAGCGCGTTGGAGTCGGTCAACAGGTTCTGTGGCGCGCGAGGCCGGCAAGTACGGTGTGCGTTCGAA  
TCTCGTTGCCCGAGGCCCTATCCGGACGCTGGCGATGAGTGCGATCGTCGGCGGTGCGCTCGGCGAGGAG  
GCCGGCGCCAGATCCAGCTGCTCGAGGAGGGCTGGGATCAGCGCGCTCCGATCGGCTGGAACATGAAGG  
ATGCGACGCCGGTCCGAAGACGGTGTGCGCGCTGCTGTCTGACTGGCTGCCGGCGACCACGGGTGACAT  
CATCTACGCCGACGGCGGCGCGCACACCAATTGCTCTAG

Muestra H37Rv  
Gen inhA mabA  
Wild Type

>H37Rv\_MabA\_promoter

GTGGACATACCGATTTCGGCCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0202  
Gen inhA mabA  
Mutación c 15t

>fedora0202c\_MabA\_promoter

GTGGACATACCGATTTCGGCCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0208  
Gen inhA mabA  
Mutación c 15t

>fedora0208e\_MabA\_promoter

GTGGACATACCGATTTCGGCCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0402  
Gen *inhA mabA*  
Mutación Wild type

>fedora0402\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0409  
Gen *inhA mabA*  
Mutación Wild type

>fedora0409\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0605  
Gen *inhA mabA*  
Mutación c 15t

>fedora0605\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0708  
Gen *inhA mabA*  
Mutación c 15t

>fedora0708c\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG

Muestra 0801  
Gen *inhA mabA*  
Mutación Wild type

>fedora0801c\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

Muestra 1005  
Gen *inhA mabA*  
Mutación Wild type

>fedora1005\_MabA\_promoter  
GTGGACATACCGATTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

**ALINEAMIENTO MULTIPLE DE LAS SECUENCIAS DEL GEN *inhA***  
***mabA* (promotor) UTILIZANDO LA HERRAMIENTA CLUSTAL W**

H37Rv GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0202c GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG  
fedor0208e GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG  
fedor0402 GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0409 GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor0605 GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG  
fedor0708c GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGATGATAGGTTGTCGGG  
fedor0801c GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG  
fedor1005 GTGGACATACCGATTTTCGGCCCGGCCGCGGCGAGACGATAGGTTGTCGGG

De manera resumida la Tabla 7 muestra las mutaciones no sinónimas identificadas en los productos de secuenciación de los 67 aislados MDR

**TABLA 7 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0201	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0202	COLON	C 15T	---	D516F
0203	COMARCA NGOBE BUGLE	C 15T	S315T	S531L
0205	COLON	---	S315T	S531L
0206	PANAMA ESTE	C 15T	---	S531L
0207	COLON	---	S315T	S531L
0208	COLON	C 15T	---	D516F
0209	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0301	PANAMA OESTE	---	S315T	S531L
0303	PANAMA ESTE	C 15T	---	S531L
0304	COMARCA NGOBE BUGLE	---	S315T	S531L
0305	SAN MIGUELITO	----	---	S531L
0306	COLON	----	S315T	S531L
0307	COLON	---	S315T	S531L
0308	COLON	----	S315T	S531L
0309	PANAMA METRO	C 15T	---	D516F
0311	COLON	---	S315T	S531L
0313	CHIRIQUI	----	S315T	S531L
0314	COLON	----	S315T	S531L
0315	PANAMA METRO	C 15T	----	S531L
0316	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0317	COLON	----	S315T	S531L
0401	COLON	---	S315T	S531L
0402	PANAMA METRO	----	---	S531L
0403	CHIRIQUI	----	----	S531L
0404	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0405	SAN MIGUELITO	---	S315T	S531L
0407	COLON	----	S315T	S531L
0408	VERAGUAS	---	----	S531L
0409	BOCAS DEL TORO	----	S315T	S531L
0410	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0411	PANAMA METRO	---	S315T	S531L
0412	COLON	---	S315T	S531L
0501	COLON	---	S315T	S531L
0503	BOCAS DEL TORO	---	S315T	S531L
0505	COLON	---	S315T	S531L
0601	COLON	----	S315T	S531L

**TABLA 7 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0602	COMARCA NGOBE BUGLE	----	----	S531L
0603	COLON	----	S315T	S531L
0604	COLON	----	S315T	S531L
0605	PANAMA METRO	C 15T	S315T	H526D
0606	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0607	COCLE	----	S315T	S531L
0609	COLON	----	S315T	S531L
0610	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0611	SAN MIGUELITO	----	S315T	H526D
0702	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0703	COLON	C 15T	----	H526D
0704	PANAMA METRO	----	----	H526D
0707	COLON	----	S315T	S531L
0708	PANAMA METRO	C 15T	----	H526D
0801	SAN MIGUELITO	----	----	----
0802	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0803	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0804	PANAMA OESTE	----	S315T	S531L
0805	PANAMA METRO	----	----	H526D
0902	PANAMA METRO	C 15T	S315T	S531L
0903	CHIRIQUI	----	S315T	S531L
0904	COLON	----	S315T	S531L
0906	PANAMA METRO	----	----	H526D
0907	PANAMA METRO	C 15T	----	S531L
0908	PANAMA METRO	----	----	S531L
0909	COLON	----	S315T	S531L
1005	CHIRIQUI	----	S315T	H526Y
1006	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
1007	PANAMA METRO	----	----	H526D
1101	PANAMA METRO	C 15T	S315T	D516V

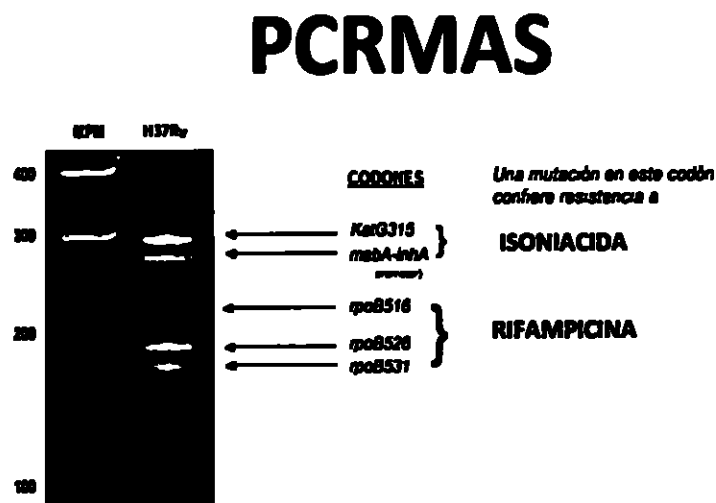
También se analizaron los productos de secuenciación de los 31 aislados sensibles en los cuales no se observó ninguna mutación no sinónima (Tabla 8)

**TABLA 8 AISLADOS SENSIBLES**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
7	PANAMA METRO	----	----	----
91	PANAMA METRO	----	----	----
92	PANAMA METRO	----	----	----
137	PANAMA METRO	----	----	----
157	COLON	----	----	----
191	PANAMA METRO	----	----	----
211	PANAMA METRO	----	----	----
235	PANAMA METRO	----	----	----
267	PANAMA METRO	----	----	----
268	PANAMA METRO	----	----	----
270	PANAMA METRO	----	----	----
327	PANAMA METRO	----	----	----
330	PANAMA METRO	----	----	----
333	PANAMA METRO	----	----	----
363	PANAMA ESTE	----	----	----
377	COLON	----	----	----
382	PANAMA METRO	----	----	----
386	PANAMA METRO	----	----	----
397	PANAMA METRO	----	----	----
400	PANAMA METRO	----	----	----
402	PANAMA METRO	----	----	----
404	PANAMA METRO	----	----	----
406	PANAMA METRO	----	----	----
425	PANAMA METRO	----	----	----
427	PANAMA METRO	----	----	----
432	PANAMA METRO	----	----	----
437	PANAMA METRO	----	----	----
441	PANAMA METRO	----	----	----
462	COLON	----	----	----
465	COLON	----	----	----
498	PANAMA METRO	----	----	----

### ➤ PCR MULTIPLE ALELO ESPECÍFICO

Luego de realizar PCRMAS a 66 aislados MDR y 31 aislados sensibles utilizando la mezcla de reacción de la Tabla 6 los productos de amplificación fueron detectados a través de electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. La presencia de amplificación observada a través de una banda de peso molecular correspondiente al gen estudiado se interpreta como ausencia de la mutación en la muestra. Por el contrario si no se produce la banda se interpreta como presencia de la mutación en la muestra ya que los cebadores están diseñados para detectar el wild type. Como se muestra en la Figura 9

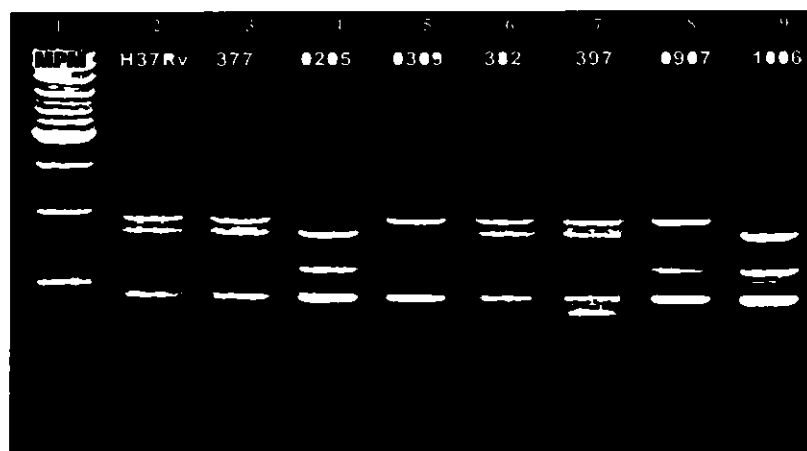


**Figura 9**



## **PCR MAS Electroforesis en gel de agarosa 2.5%**

**Figura 10**



**Figura 10 Electroforesis de los productos de amplificación de PCR MAS**

Carril 1, Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)

Carril 2 H37Rv Cepa de referencia ATCC25177 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* *rpoB531*

Carril 3 aislado 377 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* *rpoB531*

Carril 4 aislado 0205 mutación S315T *katG* + *rpoB531*

Carril 5 aislado 0309 mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB516*

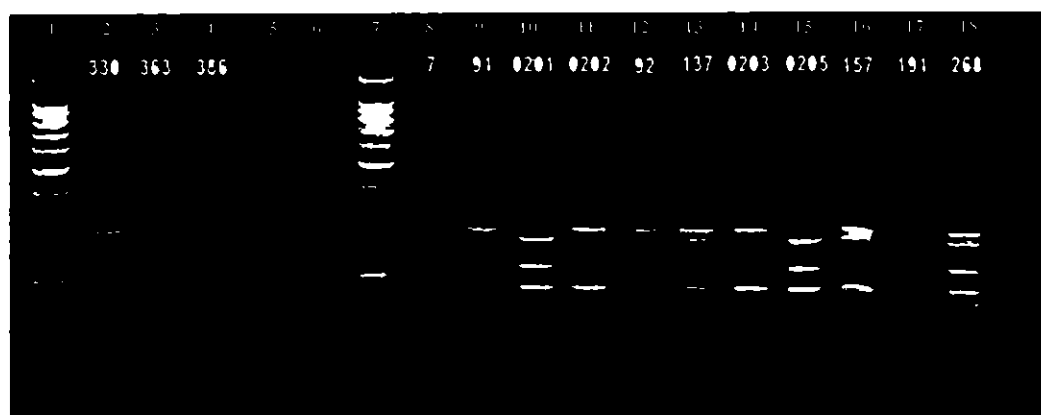
Carril 6 aislado 382 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* *rpoB531*

Carril 7 aislado 397 no presenta mutaciones S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB516* *rpoB526* *rpoB531*

Carril 8 aislado 0907 mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB531*

Carril 9 aislado 1006 mutación S315T *katG* + *rpoB531*

**Figura 11**



**Figura 11 Electroforesis de los productos de amplificación del PCRMAS**

Carril 1 Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)  
 Carril 2 aislado 330 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 3 aislado 363 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 4 aislado 386 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 7 Marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder / Promega)  
 Carril 8 aislado 7 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 9 aislado 91 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 10 aislado 0201 mutación S315T *katG* + *rpoB*531  
 Carril 11 aislado 0202 mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB*516  
 Carril 12 aislado 92 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 13 aislado 137 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 14 aislado 0203 presenta mutación c 15t *inhA* *mabA* + *rpoB*531  
 Carril 15 aislado 0205 presenta mutación S315T *katG* + *rpoB*531  
 Carril 16 aislado 157 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 17 aislado 191 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531  
 Carril 18 aislado 268 no presenta mutaciones en S315T *katG* c 15t *inhA* *mabA* *rpoB*516 *rpoB*526 ni en *rpoB*531

Las siguientes Tablas (9 y 10) muestran las mutaciones identificadas al realizar PCRMAS a cada uno de los 97 aislados en estudio

**Tabla 9 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		InhA	KatG	rpoB
0201	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0202	COLON	C 15T	---	D516F
0203	COMARCA NGOBE BUGLE	C 15T	---	S531L
0205	COLON	---	S315T	S531L
0206	PANAMA ESTE	C 15T	---	S531L
0207	COLON	----	S315T	S531L
0208	COLON	C 15T	----	D516F
0209	CHIRIQUI	----	S315T	S531L
0301	PANAMA OESTE	---	S315T	S531L
0303	PANAMA ESTE	C 15T	---	S531L
0304	COMARCA NGOBE BUGLE	---	S315T	S531L
0305	SAN MIGUELITO	---	----	S531L
0306	COLON	---	S315T	S531L
0307	COLON	---	S315T	S531L
0308	COLON	---	S315T	S531L
0309	PANAMA METRO	C 15T	----	D516F
0311	COLON	----	S315T	S531L
0313	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0314	COLON	----	S315T	S531L
0315	PANAMA METRO	C 15T	----	S531L
0316	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0317	COLON	----	S315T	S531L
0401	COLON	---	S315T	S531L
0402	PANAMA METRO	----	---	S531L
0403	CHIRIQUI	----	---	S531L
0404	CHIRIQUI	---	S315T	S531L
0405	SAN MIGUELITO	----	S315T	S531L
0407	COLON	---	S315T	S531L
0408	VERAGUAS	---	----	S531L
0410	PANAMA METRO	---	S315T	S531L
0411	PANAMA METRO	---	S315T	S531L
0412	COLON	---	S315T	S531L
0501	COLON	----	S315T	S531L
0503	BOCAS DEL TORO	---	S315T	S531L
0505	COLON	----	S315T	S531L
0601	COLON	---	S315T	S531L
0602	COMARCA NGOBE BUGLE	---	----	S531L

**Tabla 9 AISLADOS MULTIDROGA RESISTENTE (MDR)**

ID	Provincia	MUTACIÓN		
		inhA	KatG	rpoB
0603	COLON	----	S315T	S531L
0604	COLON	----	S315T	S531L
0605	PANAMA METRO	C 15T	S315T	H526D
0606	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0607	COCLE	----	S315T	S531L
0609	COLON	----	S315T	S531L
0610	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0611	SAN MIGUELITO	----	S315T	H526D
0702	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0703	COLON	C 15T	----	H526D
0704	PANAMA METRO	----	----	H526D
0707	COLON	----	S315T	S531L
0708	PANAMA METRO	C 15T	----	H526D
0801	SAN MIGUELITO	----	----	----
0802	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0803	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
0804	PANAMA OESTE	----	S315T	S531L
0805	PANAMA METRO	----	----	H526D
0902	PANAMA METRO	C 15T	S315T	S531L
0903	CHIRIQUI	----	S315T	S531L
0904	COLON	----	S315T	S531L
0906	PANAMA METRO	----	----	H526D
0907	PANAMA METRO	C 15T	----	S531L
0908	PANAMA METRO	----	----	S531L
0909	COLON	----	S315T	S531L
1005	CHIRIQUI	----	S315T	H526Y
1006	PANAMA METRO	----	S315T	S531L
1007	PANAMA METRO	----	----	H526D
1101	PANAMA METRO	C 15T	S315T	D516V

**Tabla 10 AISLADOS SENSIBLES**

<b>AISLADOS SENSIBLES</b>				
<b>PCRNAS</b>				
		<b>MUTACIÓN</b>		
<b>ID</b>	<b>Provincia</b>	<b>InhA</b>	<b>KatG</b>	<b>rpoB</b>
7	PANAMA METRO	----	----	----
91	PANAMA METRO	----	----	----
92	PANAMA METRO	----	----	----
137	PANAMA METRO	----	----	----
157	COLON	----	----	----
191	PANAMA METRO	----	----	----
211	PANAMA METRO	----	----	----
235	PANAMA METRO	----	----	----
267	PANAMA METRO	----	----	----
268	PANAMA METRO	----	----	----
270	PANAMA METRO	----	----	----
327	PANAMA METRO	----	----	----
330	PANAMA METRO	----	----	----
333	PANAMA METRO	----	----	----
363	PANAMA ESTE	----	----	----
377	COLON	----	----	----
382	PANAMA METRO	----	----	----
386	PANAMA METRO	----	----	----
397	PANAMA METRO	----	----	----
400	PANAMA METRO	----	----	----
402	PANAMA METRO	----	----	----
404	PANAMA METRO	----	----	----
406	PANAMA METRO	----	----	----
425	PANAMA METRO	----	----	----
427	PANAMA METRO	----	----	----
432	PANAMA METRO	----	----	----
437	PANAMA METRO	----	----	----
441	PANAMA METRO	----	----	----
462	COLON	----	----	----
465	COLON	----	----	----
498	PANAMA METRO	----	----	----

Cabe señalar que no se pudo realizar PCRNAS al aislado 0409 debido a cantidad insuficiente de ADN. Por lo que en total fueron analizados por PCRNAS 66 aislados MDR más los 31 aislados sensibles como control negativo.

➤ **COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCRMAS CON LOS OBTENIDOS A TRAVÉS DEL MÉTODO DE REFERENCIA**

Para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica PCRMAS se comparó los resultados con los obtenidos por el método de referencia método de las proporciones múltiples de Canetti. Los análisis se realizaron para cada una de las drogas de interés Rifampicina (gen *rpoB*) e Isoniacida (genes *katG inhA mabA*)

**Evaluación de PCRMAS versus Gold Standard**

**Resistencia a Rifampicina**

**Sensibilidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Rifampicina**

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100$$

$$S = [66 / (66 + 1)] * 100$$

$$S = 98.5\%$$

En donde

S sensibilidad

VP verdaderos positivos según el Gold Standard

FN falsos negativos

### **Especificidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Rifampicina**

$$E = [VN / (VN + FP)] * 100$$

$$E = [31 / (31 + 0)] * 100$$

$$E = 100\%$$

En donde

E especificidad

VN verdadero negativo segun Gold Standard

FP falso positivo

### **Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de PCRMAS en la detección de resistencia a Rifampicina**

Cálculo del Valor Predictivo Positivo

$$VPP = [VP / (FP + VP)] * 100$$

$$VPP = [66 / (0 + 66)] * 100$$

$$VPP = 100\%$$

En donde

VPP valor predictivo positivo

VP verdaderos positivos

FP falsos positivos

### **Cálculo del Valor Predictivo Negativo**

$$VN = [VN / (VN + FN)] * 100$$

$$VN = [31 / (31 + 1)] * 100$$

$$VN = 96.8 \%$$

### **Evaluación de PCRMAS versus Gold Standard**

#### **Resistencia a Isoniacida**

#### **Sensibilidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Isoniacida**

$$S = [VP / (VP + FN)] * 100$$

$$S = [66 / (66 + 11)] * 100$$

$$S = 85.7 \%$$

En donde

S sensibilidad

VP verdaderos positivos segun el Gold Standard

FN falsos negativos

#### **Especificidad de PCRMAS en la detección de mutaciones para Isoniacida**

$$E = [VN / (VN + FP)] * 100$$

$$E = [31 / (31 + 0)] * 100$$

$$E = 100\%$$



**En donde**

**E especificidad**

**VN verdadero negativo segun Gold Standard**

**FP falso positivo**

**Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo Negativo de PCRMAS en la  
detección de resistencia a Isoniacida**

**Cálculo del Valor Predictivo Positivo**

$$\text{VPP} = [\text{VP} / (\text{FP} + \text{VP})] * 100$$

$$\text{VPP} = [66 / (0 + 66)] * 100$$

$$\text{VPP} = 100\%$$

**En donde**

**VPP valor predictivo positivo**

**VP verdaderos positivos**

**FP falsos positivos**

**Cálculo del Valor Predictivo Negativo**

$$\text{VN} = [\text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})] * 100$$

$$\text{VN} = [31 / (31 + 11)] * 100$$

$$\text{VN} = 73.8 \%$$

## DISCUSIÓN

Este estudio ha identificado por primera vez las mutaciones más comunes que confieren resistencia a Isoniacida y Rifampicina en aislados clínicos panameños TB MDR. Además hemos evaluado y confirmado la sensibilidad y especificidad de la técnica PCRMAS como prueba molecular rápida y económica que permitirá la reducción en la demora del diagnóstico actual de los casos MDR en Panamá.

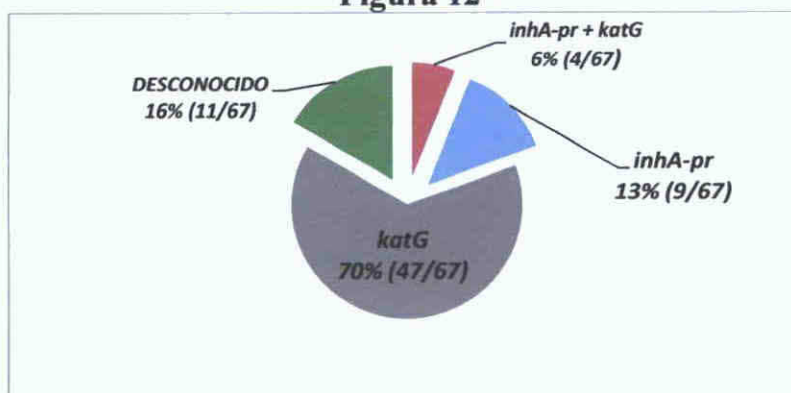
Se detectó en 70.1% de los aislados TB MDR panameños resistentes a INH presentaron la mutación S315T/G en el gen *katG* y en un 19.4% la mutación 15C→T en el operón *mabA inhA*. Estos datos son similares a estudios realizados en otras regiones geográficas los cuales reportan una frecuencia de 60.4 – 93.6% para *katG* en el codón 315 y 1.8 – 50% para mutaciones en la posición 15 del operón *mabA inhA* (121, 122, 123, 124, 119, 125, 126, 127, 128, 129). Es importante señalar que un 16.4% (11) de los aislados TB MDR resistentes a INH no mostraron mutaciones en ninguno de los genes analizados en este estudio (*katG inhA mabA inhA*) lo cual puede sugerir otros posibles mecanismos de resistencia (menos frecuentes) en otros genes como *ndh iniC efpA ahpC kasA* y otros. Esto significa que las muestras (0305, 0402, 0403, 0408, 0602, 0704, 0801, 0805, 0906, 0908, 1007) serían detectados como aislados sensibles a INH por cualquier técnica molecular existente actualmente en el mercado. En estos casos los métodos microbiológicos convencionales de sensibilidad estándar (el método de las proporciones

múltiples de Canetti u otro método convencional como el método de la nitrata), son las únicas pruebas capaces de detectar la resistencia, ya que la misma es resultado de otros mecanismos menos frecuentes.

Una de las ventajas de identificar las mutaciones genéticas individuales es que permiten determinar el nivel de resistencia al fármaco, así como la probable resistencia cruzada con otros fármacos que estén dentro del esquema de tratamiento. En base a estudios previos <sup>(76,77)</sup> se puede inferir que el 70% de los aislados TB-MDR en Panamá durante la década pasada presentaron un alto nivel de resistencia a INH. Aunado a esto, un 19% de los casos TB-MDR tenían un alto grado de probabilidad de mostrar resistencia cruzada con etionamida, fármaco empleado en el esquema de tratamiento de segunda línea <sup>(65,66,67,68,69)</sup>.

#### Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a INH en aislados MDR

Figura 12

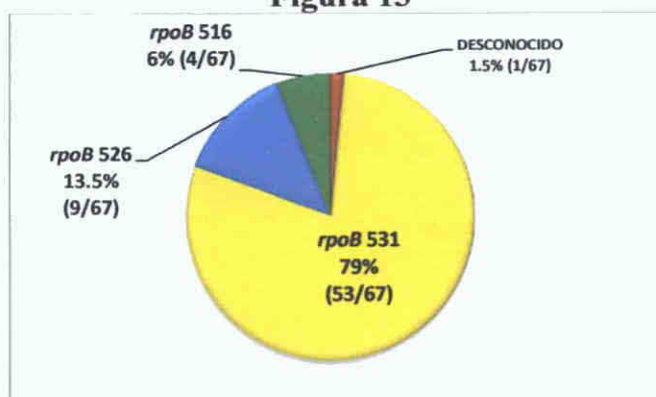


En relación a las mutaciones que confieren resistencia a Rifampicina se detectó que el codón 531 en el gen *rpoB* fue el sitio mutado más frecuente dentro de los aislados en este estudio (79.1%). Estos resultados son consistentes con otros estudios que han reportado mutación en este sitio en un rango de 40.1 – 82.4% en aislados provenientes de México, Brasil, Cape Town, China, Rusia, Korea, Georgia, Vietnam, India, Países del Este Asiático y Sudáfrica <sup>(121, 122, 123, 124, 119, 125, 126, 127, 128, 129)</sup>. El resto de los aislados presentaron mutación en un 13.4% en el codón 526 y 6.0% en el codón 516, muy similar a lo que se ha reportado también en estos sitios (5.9 – 40% y 2.9 – 16.7%, respectivamente).

Estos resultados permiten inferir que la mayoría de los pacientes con TB-MDR (79%) presentaron un alto nivel de resistencia a RIF y probable resistencia cruzada a todas las rifamicinas (rifabutina y rifapentina) <sup>(100)</sup>.

### Mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a RIF en aislados MDR

**Figura 13**



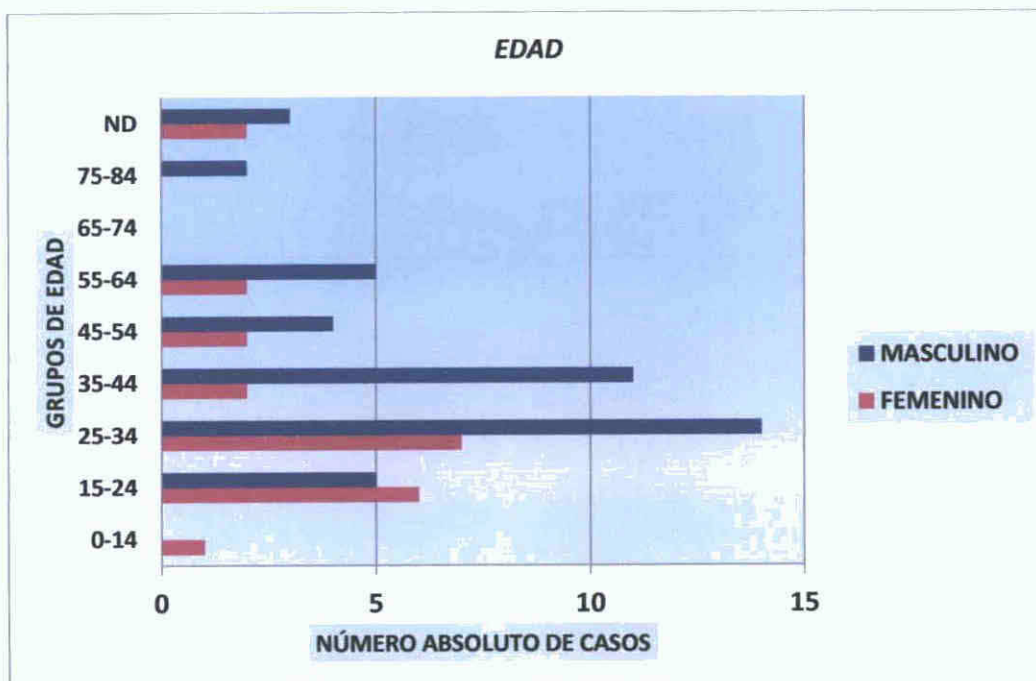
Un caso en particular (0801) fue resistente a RIF por el método convencional gold estándar (método de las proporciones múltiples de Canetti) sin embargo no presentó mutación en el gen *rpoB* que es el responsable del 96-98% de la resistencia a RIF sugiriendo que podría tratarse de otro mecanismo de resistencia menos frecuente a rifampicina. Se puede sugerir que las diferentes cepas de MTB que circulan en Panamá, pueden deberse a diferentes eventos de importación provenientes de diversas partes del mundo por nuestra posición geográfica, económica y turística.

Al evaluar la técnica molecular PCRMAS empleada también en otros países con alta carga de casos MDR encontramos un 100% de reproducibilidad al compararse con los resultados de secuenciación y un 85.7% y 98.5% de sensibilidad en la detección de resistencia a INH y RIF respectivamente al ser comparado con el método de las proporciones múltiples de Canetti.

Cuarenta y cuatro de los 67 casos analizados en este estudio correspondían a muestras de hombres con un rango de edad de 14 a 81 años (Figura 17).

**Figura 14**

**Rangos de edad versus género de los aislados en estudio**



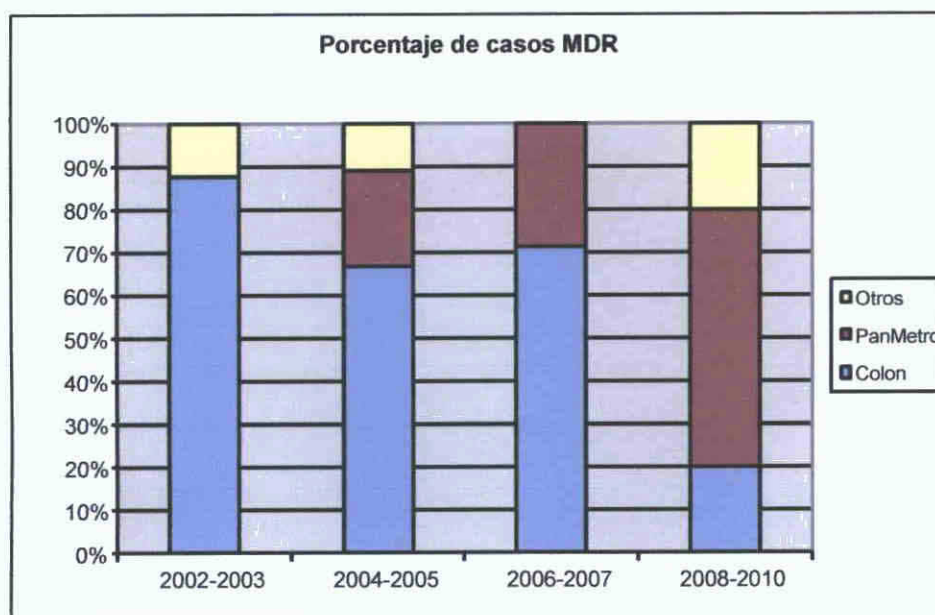
Se detectó una mayor distribución geográfica de los casos en las provincias de Colón (23) y Panamá Metro (21). Estos resultados corresponden con lo presentado en un estudio previo (2002-2004) que reportaron un alto porcentaje de TB-MDR en el área Metropolitana de la ciudad de Panamá y Colón <sup>(120)</sup>.

La información epidemiológica de cada uno de estos aislados data de hace diez años y fue incompleta en la mayoría de los casos, esto no permitió determinar o identificar el caso índice. Sin embargo, al analizar la frecuencia de casos por área geográfica a través de los 10 años, se observó que en los

años 2002-2003 la frecuencia de casos MDR era alta en la provincia de Colón. Durante los años subsiguientes fueron apareciendo casos en Panamá Metro y pocos en otras áreas, con una disminución simultánea de los casos en la ciudad de Colón.

**Figura 15**

**Porcentaje de casos MDR por año y distribución geográfica**



## **CONCLUSIONES**

- 1      Esta investigación ha permitido identificar y determinar la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia a los dos principales fármacos antifímicos isonizacida y rifampicina**
- 2      Las mutaciones más comunes en el gen *rpoB* son las responsables de casi el 100% de resistencia a rifampicina en los aislados TB MDR panameños**
- 3      La gran mayoría de la resistencia a isoniacida en Panamá se debe a mutaciones en el gen *katG* y en el promotor *inhA***
- 4      Las ventajas de conocer la frecuencia de las mutaciones que confieren resistencia en los aislados TB MDR que circulan en nuestro país es que nos permite elegir e implementar una técnica molecular que reduce el tiempo de diagnóstico en las instalaciones de salud y además permite inferir el nivel de resistencia a los fármacos o la presencia de resistencia cruzada con otros fármacos del esquema de tratamiento para tuberculosis**



- 5 La técnica PCRMAS es un método molecular sensible específico rápido y económico que puede ser utilizado para la detección de las 5 mutaciones más frecuentes y puede ser empleada como una técnica preliminar mientras transcurren las 4 semanas de incubación del método de Canetti (técnica Gold Standard de sensibilidad en TB) que confirmará el resultado**

## **RECOMENDACIONES**

- **La Organización Mundial de la Salud sugiere cada vez más el uso de técnicas moleculares para la detección de la tuberculosis resistente. El Programa Nacional contra la Tuberculosis de Panamá debe asumir este reto ya que estos métodos reducen considerablemente el tiempo de diagnóstico lo cual representa una interrupción oportuna de la cadena de transmisión de esta enfermedad**
- **Se requiere de otros estudios para poder dilucidar los mecanismos de resistencia presentes en los aislados que no mostraron las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina y a isoniazida en los genes previamente descritos**
- **Es necesario realizar investigaciones empleando técnicas de epidemiología molecular que permitan esclarecer la dinámica de la transmisión de la tuberculosis en nuestro país y a su vez evaluar las medidas de control que realiza el programa de tuberculosis a nivel nacional**

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. "La tuberculosis en la Región de las Américas. Informe Regional 2011. Epidemiología, control y tratamiento".  
[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=docview&gid=22954&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=docview&gid=22954&Itemid=)
2. Organización Mundial de la Salud. "La tuberculosis farmacoresistente alcanza niveles desconocidos hasta ahora". 2010.  
[http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug\\_resistant\\_tb\\_20100318/es/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/drug_resistant_tb_20100318/es/)
3. Nobelprize.org. "Robert Koch and Tuberculosis". 2003.  
<http://www.nobelprize.org/educational/medicine/tuberculosis/readmore.html>
4. La Enciclopedia Libre. "Mycobacterium tuberculosis".  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium>
5. Rodríguez, G. "Mycobacterias". Temas de Bacteriología y Virología Médica. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf>
6. Ramirez Rivera N.A., et al. "Mycobacterium tuberculosis: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa". Revista Médica. Vol 2. Num.2. Jul-Dic 2002.  
[http://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol2\\_num2/articulos/mycobaterium.html](http://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol2_num2/articulos/mycobaterium.html)
7. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev Infect Dis 1989;11 Suppl 2:420-430.
8. Warwick JB, Paul W, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. Trends Microbiol 1994;2:284-288.
9. Steck PA, Schwartz MS, Rosendhal G, Gray R. Mycolic acids: a reinvestigation. J Biol Chem 1978;253:5625-5709.
10. Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. Front Biosci 1998;3:1253-1261.

- 11 Crick DC Mahapatra S Brennan PJ Biosynthesis of the arabinogalactan peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis* *Glycobiol* 2001 11 107R 118R
- 12 Varki A Cummings R, Esko J Freeze H Hart G Marth J Editors Bacterial polysaccharides In *Essential of glycobiology* NY Cold Spring Harbor Press 1999 p 321 332
- 13 Ehlers MR, Daffe M Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 1998 6 328 335
- 14 Schabbing RW Garcia A Hunter RL Characterization of the trehalose 6,6 dimycolate Surface monolayer by scanning tunneling microscopy *Infect Immun* 1994 63 754 756
- 15 Wolinsky E *Mycobacterium* En Davis B Dublecco R, Eisen H Ginsber H editores *Tratado de microbiologia* 3ra ed Mexico Salvat, 1990 p 589 604
- 16 Vergne I Daffe M Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells *Front Biosci* 1998 3 d865-d876
- 17 Brennan PJ Nikaido H The envelope of mycobacteria *Annu Rev Biochem* 1995 64 29 63
- 18 Besra GS Chatterjee J Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis* In Bloom BR, editor *Tuberculosis pathogenesis protection and control* Washington DC ASM Press 1994 p 285 306
- 19 Barnes PF Chatterjee D Abrams JS Lu S Wang E Yamamura M et al Cytokine production induced by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan Relationship to chemical structure *J Immunol* 1992 149 541 547
- 20 St Denis A Caouras V Gervais F Descoteaux A Role of protein kinase C  $\alpha$  in the control of infection by intracellular pathogens in macrophage *J Immunol* 1999 163 5505 5511
- 21 Tan SL Parker PJ Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling *Biochem J* 2003 376(Pt 3) 545 552

22. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopatología de tuberculosis; roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 683-690.
23. Todo lo que necesitas saber para todos. "Lipoarabinomannan, Fondo y Estructura. <http://lasaludfamiliar.com/caja-de-cerebro/conocimiento-3075.html>
24. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66:1277-1281
25. Publicación del genoma. [http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B\\_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm)
26. Patogenia e Inmunidad (TB). [http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/Academico/Material\\_de\\_Estudio/micobacterias/patologia/patologia.html](http://www.fcq.uach.mx/phocadownload/Academico/Material_de_Estudio/micobacterias/patologia/patologia.html)
27. Centros para el control y la prevención de enfermedades. "Datos básicos de la Tuberculosis". <http://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/default.htm#ltbi>
28. Wayne LG. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:908-14.
29. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:267-74.
30. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 1994;123:11-8.
31. Gillespie SH. Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:267-74.
32. Combs DL, O'Brien RJ, Geiter LJ. USPHS Tuberculosis Short-Course Chemotherapy Trial 21: effectiveness, toxicity, and acceptability. The report of final results. *Ann Intern Med* 1990;112:397-406.
33. Bass JB Jr, Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Rubén F, et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and

children American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention *Am J Respir Crit Care Med* 1994 149 1359 74

- 34 Pere Coll Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003 21(6) 299 308
- 35 Banerjee A Dubnau E Quemard A Balasubramanian V Um KS Wilson T et al *inhA* a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* *Science* 1994 263 227 30
- 36 Davidson PT Treatment of mycobacterial infections *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1988 63 23 5
- 37 Bloom BR, Murray CJ Tuberculosis Commentary on a reemergent killer *Science* 1992 257 1055 64
- 38 Dye C Scheele S Dolin P Pathania V Raviglione MC Consensus statement Global burden of tuberculosis Estimated incidence prevalence and mortality by country WHO Global Surveillance and Monitoring Project *Jama* 1999 282 677 86
- 39 Haas DW Des Prez RM Tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome A historical perspective on recent developments *Am J Med* 1994 96 439 50
- 40 Pablos Méndez A Raviglione MC Laszlo A Binkin N Rieder HL Bustreo F et al Global surveillance for antituberculosis drug resistance 1994 1997
- 41 World Health Organization International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti Tuberculosis Drug Resistance Surveillance *N Engl J Med* 1998 338 1641 9
- 42 Robitzek, E H & Selikoff I J (1952) Hydrazine derivatives of isonicotinic acid (rimifon marsilid) in the treatment of active progressive caseous pneumonic tuberculosis a preliminary report *Am Rev Tuberc* 65 402-428
- 43 Slayden R A & Barry C E III (2000) The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Microbes Infect* 2 659 669

- 44 Quy H T Buu T N Cobelens F G Lan N T Lambregts C S & Borgdorff M W (2006) Drug resistance among smear positive tuberculosis patients in Ho Chi Minh City Vietnam *Int J Tuberc Lung Dis* 10 160 166
- 45 Balabanova, Y Drobniewski F Fedorin I Zakharova, S Nikolayevskyy V Atun R & Coker R (2006) The Directly Observed Therapy Short Course (DOTS) strategy in Samara Oblast, Russian Federation *Respir Res* 7 44
- 46 Mackaness G B & Smith N (1952) The action of isoniazid (isonicotinic acid hydrazide) on intracellular tubercle bacilli *Am Rev Tuberc* 66 125 133
- 47 Suter E (1952) Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated in vitro and effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazide *Am Rev Tuberc* 65 775 776
- 48 Tsukamura, M Tsukamura, S & Nakano E (1963) The uptake of isoniazid by mycobacteria and its relation to isoniazid susceptibility *Am Rev Respir Dis* 87 269 275
- 49 Bardou F Raynaud C Ramos C Laneelle M A & Laneelle G (1998) Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis* *Microbiology* 144 (Pt 9) 2539 2544
- 50 Gangadharam P R Harold, F M & Schaefer W B (1963) Selective inhibition of nucleic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* by isoniazid *Nature* 198 712 714
- 51 Brennan P J Rooney S A & Winder F G (1970) The lipids of *Mycobacterium tuberculosis* BCG fractionation composition, turnover and the effects of isoniazid *Ir J Med Sci* 3 371 390
- 52 Winder F G & Collins P B (1970) Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* *J Gen Microbiol* 63 41-48
- 53 Takayama, K Schonoes H K Armstrong E L & Boyle R W (1975) Site of inhibitory action of isoniazid in the synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* *J Lipid Res* 16 308 317



54. Publicación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*  
[http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B\\_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm](http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs0203/B_Rilova/Copia%20de%20proyectoBIO/SECUENCIACION/secuenciacion.htm)
55. Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 2004; 39: 1045-53.
56. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, Al-Feel W, Hsu M, bu- Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8695-9.
57. Kuziora MA, Chalmers Jr JH, Douglas MG, Hitzeman RA, Mattick JS, Wakil SJ. Molecular cloning of fatty acid synthetase genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1983; 258: 11648-53.
58. Sintchenko V, Chew WK, Jelfs PJ, Gilbert GL. Mutations in *rpoB* gene and rifabutin susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia. *Pathology* 1999; 31: 257-60.
59. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1969-73.
60. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-30.
61. Quemard A, Laneelle G, Lacave C. Mycolic acid synthesis: a target for ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1316-21.
62. Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* 2000; 275: 28326-31.
63. DeBarber AE, Mdluli K, Bosman M, Bekker LG, Barry III CE. Ethionamide activation and sensitivity in multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9677-82.



- 64 Vannelli TA Dykman A Ortiz de Montellano PR The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase *J Biol Chem* 2002 277 12824 9
- 65 Heifets LB Antimycobacterial drugs *Semin Respir Infect* 1994 9 84 103
- 66 Lavender C Globan M Sievers A Billman Jacobe H Fyfe J Molecular characterization of isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Australia *Antimicrob Agents Chemother* 2005 49 4068 74
- 67 Lee H Cho SN Bang HE Lee JH Bai GH Kim SJ et al Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea *Int J Tuberc Lung Dis* 2000 4 441 7
- 68 Morlock GP Metchock B Sikes D Crawford JT Cooksey RC *EthA inhA and katG* loci of ethionamide resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates *Antimicrob Agents Chemother* 2003 47 3799 805
- 69 Rock CO Cronan JE *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis *Biochim Biophys Acta* 1996 1302 1 16
- 70 Middlebrook, G (1954) Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli a preliminary report *Am Rev Tuberc* 69 471–472
- 71 Rouse D A DeVito J A Li Z Byer H & Morris S L (1996) Site directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase peroxidase activities and isoniazid resistance *Mol Microbiol* 22 583–592
- 72 Cockerill FR III Uhl JR, Temesgen Z Zhang Y Stockman L Roberts GD et al Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance *J Infect Dis* 1995 171 240 5
- 73 Hofling CC Pavan EM Giampaglia CM Ferrazoli L Aily DC de Albuquerque DM et al Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil *Int J Tuberc Lung Dis* 2005 9 87 93

- 74 Abate G Hoffner S E Thomsen V O & Miorner H (2001) Characterization of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of phenotypic properties and mutations in *katG* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20 329–333
- 75 Musser J M Kapur V Williams D L Kreiswirth B N van Soolingen D & van Embden J D (1996) Characterization of the catalase peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing restricted array of mutations associated with drug resistance *J Infect Dis* 173 196–202
- 76 Rouse D A DeVito J A Li Z Byer H & Morris S L (1996) Site directed mutagenesis of the *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis* effects on catalase peroxidase activities and isoniazid resistance *Mol Microbiol* 22 583–592
- 77 Saint Joanis B Souchon H Wilming M Johnsson K Alzari P M & Cole S T (1999) Use of site-directed mutagenesis to probe the structure function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase *KatG* from *Mycobacterium tuberculosis* *Biochem J* 338 (Pt 3) 753–760
- 78 Bertrand, T Eady N A Jones J N Jesmin Nagy J M Jamart Gregoire B Raven E L Brown K A (2004) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase peroxidase *J Biol Chem* 279 38991–38999
- 79 Mdluli K Slayden R A Zhu Y Ramaswamy S Pan X Mead, D Crane D D Musser J M & Barry C E 3rd (1998) Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta ketoacyl ACP synthase by isoniazid *Science* 280 1607–1610
- 80 Lee A S Teo A S & Wong S Y (2001) Novel mutations in *ndh* in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates *Antimicrob Agents Chemother* 45 2157–2159
- 81 Piatek, A S Telenti A Murray M R El Hajj H Jacobs W R Jr Kramer F R & Alland, D (2000) Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons implications for rapid susceptibility testing *Antimicrob Agents Chemother* 44 103–110

- 82 Slayden R A Lee R E & Barry C E III (2000) Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of *Mycobacterium tuberculosis* *Mol Microbiol* 38 514–525
- 83 Larsen M H Vilcheze C Kremer L Besra, G S Parsons L Salfinger M Heifets L Hazbon M H Alland D Sacchettini J C & Jacobs W R Jr (2002) Overexpression of *inhA* but not *kasA* confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis* *M bovis* BCG and *M tuberculosis* *Mol Microbiol* 46 453–466
- 84 Kremer L Dover L G Morbidoni H R Vilcheze C Maughan W N Baulard, A Tu S C Honore N Deretic V Sacchettini J C Locht, C Jacobs W R Jr & Besra, G S (2003) Inhibition of *InhA* activity but not *KasA* activity induces formation of a *KasA* containing complex in mycobacteria *J Biol Chem* 278 20547–20554
- 85 Miesel L Weisbrod, T R Marcinkeviciene J A Bittman R & Jacobs W R Jr (1998) NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis* *J Bacteriol* 180 2459–2467
- 86 Wilson T M & Collins D M (1996) *ahpC* a gene involved in isoniazid resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex *Mol Microbiol* 19 1025–1034
- 87 Telenti A Honore N Bernasconi C March, J Ortega, A Heym B Takiff H E & Cole S T (1997) Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a blind study at reference laboratory level *J Clin Microbiol* 35 719–723
- 88 Sherman D R Mdluli K Hickey M J Arain T M Morris S L Barry C E 3rd & Stover C K (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* *Science* 272 1641–1643
- 89 Guimaraes B G Souchon, H Honore N Saint Joanis B Brosch R. Shepard, W Cole S T & Alzari P M (2005) Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase *AhpC* a key element of the *Mycobacterium tuberculosis* defense system against oxidative stress *J Biol Chem* 280 25735–25742

- 90 Sensi P (1983) History of the development of rifampin *Rev Infect Dis* 5 Suppl 3 S402–S406
- 91 Lounis N & Roscigno G (2004) In vitro and in vivo activities of new rifamycin derivatives against mycobacterial infections *Curr Pharm Des* 10 3229–3238
- 92 Donald P R Sirgel F A Botha, F J Seifart, H I Parkin D P Vandenplas M L Van de Wal B W Maritz, J S & Mitchison D A (1997) The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis *Am J Respir Crit Care Med* 156 895–900
- 93 Chan, S L Yew W W Ma, W K Girling D J Aber V R Felmingham D Allen B W & Mitchison, D A (1992) The early bactericidal activity of rifabutin measured by sputum viable counts in Hong Kong patients with pulmonary tuberculosis *Tuber Lung Dis* 73 33–38
- 94 Grosset, J Lounis N Truffot Pernot, C O'Brien R J Ravighione M C & J, B (1998) Once weekly rifapentine-containing regimens for treatment of tuberculosis in mice *Am J Respir Crit Care Med* 157 1436–1440
- 95 Mitchison D A (1985) [Mechanisms of the action of drugs in the short course chemotherapy] *Bull Int Union Tuberc* 60 36–40
- 96 Nightingale S D Cameron D W Gordin F M Sullam P M Cohn D L Chaisson R E Eron L J Sparta P D Bihari B Kaufman D L & et al (1993) Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS *N Engl J Med* 329 828–833
- 97 Sullam P M Gordin F M & Wynne B A (1994) Efficacy of rifabutin in the treatment of disseminated infection due to *Mycobacterium avium* complex The Rifabutin Treatment Group *Clin Infect Dis* 19 84–86
- 98 Benator D Bhattacharya, M Bozeman, L Burman W Cantazaro A Chaisson R Gordin F Horsburgh C R Horton, J Khan A Lahart, C Metchock, B Pachucki C Stanton L Vernon A Villarino M E Wang Y C Weiner M & Weis S (2002) Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid

twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a randomised clinical trial *Lancet* 360: 528–534

- 99 Vernon A (2000) Rifamycin antibiotics with a focus on newer agents. In *Tuberculosis* 2nd edition (Rom W & Garay S eds) pp 7759–7771. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- 100 Wade M M & Zhang, Y (2004) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci* 9: 975–994
- 101 Hartmann, G, Honikel K O, Knusel F & Nuesch, J (1967) The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifampicin. *Biochim Biophys Acta* 145: 843–844
- 102 Campbell E A, Korzheva, N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A & Darst, S A (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104: 901–912
- 103 Ramaswamy S & Musser J M (1998) Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79: 3–29
- 104 Jin D J & Gross C A (1988) Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 202: 45–58
- 105 Ovchinnikov Y A, Monastyrskaya, G S, Guriev S O, Kalinina, N F, Sverdlov E D, Gragerov A I, Bass I A, Kiver I F, Moiseyeva, E P, Igumnov V N, Mindlin S Z, Nikiforov V G & Khesin R B (1983) RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: sequence changes and dominance. *Mol Gen Genet* 190: 344–348
- 106 Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston M J, Matter L, Schopfer K & Bodmer T (1993) Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647–650
- 107 Musser J M (1995) Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 8: 496–514

- 108 Kapur V Li L L Hamrick M R Plukaytis B B Shinnick T M Telenti A Jacobs W R Jr Banerjee A Cole S Yuen K Y & et al (1995) Rapid Mycobacterium species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing Arch Pathol Lab Med 119 131–138
- 109 Williams D L Waguespack C Eisenach K Crawford, J T Portaels F Salfinger M Nolan, C M Abe C Sticht Groh V & Gillis T P (1994) Characterization of rifampin resistance
- 110 Billington O J McHugh T D & Gillespie S H (1999) Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in Mycobacterium tuberculosis Antimicrob Agents Chemother 43 1866–1869
- 111 Kapur V Li L L Iordanescu S Hamrick M R Wanger A Kreiswirth B N & Musser J M (1994) Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas J Clin Microbiol 32 1095–1098
- 112 Bodmer T Zurcher G Imboden P & Telenti A (1995) Mutation position and type of substitution in the beta subunit of the RNA polymerase influence in vitro activity of rifamycins in rifampicin resistant Mycobacterium tuberculosis J Antimicrob Chemother 35 345–348
- 113 Williams D L Spring L Collins L Miller L P Heifets L B Gangadharam P R & Gillis T P (1998) Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross resistance in Mycobacterium tuberculosis Antimicrob Agents Chemother 42 1853–1857
- 114 Heep M Brandstatter B Rieger U Lehn N Richter E Rusch Gerdes S & Niemann S (2001) Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates J Clin Microbiol 39 107–110
- 115 Heep M Odenbreit, S Beck, D Decker J Prohaska, E Rieger U & Lehn N (2000) Mutations at four distinct regions of the rpoB gene

can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins  
**Antimicrob Agents Chemother 44 1713–1715**

- 116 Dabbs E R Yazawa, K Mikami Y Miyaji M Morisaki N Iwasaki S & Furihata, K (1995) Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation **Antimicrob Agents Chemother 39 1007–1009**
- 117 Quan S Venter H & Dabbs E R (1997) Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic **Antimicrob Agents Chemother 41 2456–2460**
- 118 Yang Z R Durmaz, D Yang S Gunal L Zhang B Foxman A Sanic & C F Marrs (2005) Simultaneous detection of isoniazid, rifampin and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele specific polymerase chain reaction (PCR) assay **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 53 201 208**
- 119 Mokrousov I O Narvskaya, T Otten E Limeschenko L Steklova & B Vyshnevskiy (2002) High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46(5) 1417–1424**
- 120 High clustering rates of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama Rosas et al **BMC Infectious Diseases 2013 13 442**
- 121 Hofling CC Pavan EM Giampaglia CM Ferrazoli L Aily DC et al (2005) Prevalence of katG Ser315 substitution and rpoB mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil **Int J Tuberc Lung Dis 9 87–93**
- 122 Afanas ev MV Ikryannikova LN Il ina EN Sidorenko SV Kuz min AV et al (2007) Molecular characteristics of rifampicin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation **J Antimicrob Chemother 59 1057–1064**
- 123 Caws M Duy PM Tho DQ Lan NT Hoa DV et al (2006) Mutations prevalent among rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a hospital in Vietnam **J Clin Microbiol 44 2333–2337**

- 124 Gegia M Mdivani N Mendes RE Li H Akhalaia M et al (2008) Prevalence of and molecular basis for tuberculosis drug resistance in the Republic of Georgia validation of a QIAplex system for detection of drug resistance related mutations *Antimicrob Agents Chemother* 52 725–729
- 125 Park YK Shin S Ryu S Cho SN Koh WJ et al (2005) Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea *J Microbiol Methods* 63 165–172
- 126 Qian L Abe C Lin TP Yu MC Cho SN et al (2002) *rpoB* genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian countries *J Clin Microbiol* 40 1091–1094
- 127 Ramaswamy SV Dou SJ Rendon A Yang Z Cave MD et al (2004) Genotypic analysis of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey Mexico *J Med Microbiol* 53 107–113
- 128 Van Rie A Warren R, Mshanga I Jordaan AM van der Spuy GD et al (2001) Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community *J Clin Microbiol* 39 636–641
- 129 Yue J Shi W Xie J Li Y Zeng E et al (2003) Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China *J Clin Microbiol* 41 2209–2212
- 130 Canetti G Rist N Grosset J (1963) Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions Methodology resistance criteria, results and interpretation *Rev Tuberc Penumol (Paris)* Feb Mar 27 217 72
- 131 Gorocica P y cols Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 18 – numero 2* Abril Junio 2005